

**WECHSELWIRKUNGEN  
ZWISCHEN ESSENTIELLEN  
UND TOXISCHEN  
SPURENELEMENTEN  
IN DER RATTE**

**Tierexperimentelle  
Untersuchungen mit Arsen,  
Cadmium, Nickel und Blei im Futter**

**Gerlinde Schmolke**

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



**WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN ESSENTIELLEN UND TOXISCHEN  
SPURENELEMENTEN IN DER RATTE**

**Tierexperimentelle Untersuchungen mit Arsen, Cadmium, Nickel  
und Blei im Futter**

**Dissertation  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**vorgelegt von  
Gerlinde Schmolke  
aus München**

**1989**

- 1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Forth**
  - 2. Berichterstatter : Prof. Dr. Th. Severin**
- Tag der mündlichen Prüfung : 14.2.1989**

## MEINEM MANFRED



Die vorliegende Arbeit wurde am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Forth, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Forth danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wohlwollende Unterstützung, sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Severin danke ich für sein Interesse an der Themastellung und für seine Unterstützung, die es mir ermöglichte, diese Arbeit am Walther-Straub-Institut anzufertigen.

Herrn Dr. B. Elsenhans danke ich für seine Hilfe bei der Planung der Tierexperimente, für die nützlichen Diskussionen und wertvollen Ratschläge.

Mein Dank gilt auch Herrn Samir Islambouli für die Durchführung der Nierenperfusion und allen anderen Mitarbeitern, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Abschließend möchte ich Herrn Dipl. Ing. M. Schmolke für die umfassende technische Unterstützung danken und der Firma Digital Equipment, die mir ein Computersystem zur Textverarbeitung zur Verfügung stellte.

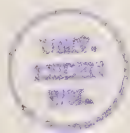


# INHALTSVERZEICHNIS

|         | Seite                                                                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1       | EINLEITUNG 1                                                                   |
| 2       | AUFGABENSTELLUNG 4                                                             |
| 3       | MATERIAL UND METHODEN 6                                                        |
| 3.1     | Futterzusammensetzung 6                                                        |
| 3.2     | Durchführung der Tierexperimente 8                                             |
| 3.2.1   | Pilotstudie 8                                                                  |
| 3.2.2   | Zeitstudie 9                                                                   |
| 3.2.3   | Untersuchungen von Rattenurin 11                                               |
| 3.3     | Metallanalytik 12                                                              |
| 3.3.1   | Aufschluß der organischen Matrix 12                                            |
| 3.3.2   | Bestimmung der Metallkonzentrationen 13                                        |
| 3.3.2.1 | Atomemissionsspektrometrie 13                                                  |
| 3.3.2.2 | Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) 14                                          |
| 3.3.3   | Qualitätssicherung der Analysenergebnisse 15                                   |
| 3.3.3.1 | Wiederfindung 15                                                               |
| 3.3.3.2 | Interelementstörungen 18                                                       |
| 3.3.3.3 | Kontamination - Abschätzung ihrer Bedeutung für<br>die vorliegenden Studien 20 |
| 3.4     | Gelchromatographie 23                                                          |
| 3.4.1   | Vorbereitung und Eichung der Säule 23                                          |
| 3.4.2   | Protein- und Metallprofil der Nierenrinden 24                                  |
| 3.5     | Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) 25                                      |

|       |                                                                                                                                |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6   | Vertikale Disk-Elektrophorese                                                                                                  | 25 |
| 3.7   | Mancini-Test                                                                                                                   | 26 |
| 3.8   | Urinuntersuchungen                                                                                                             | 27 |
| 3.9   | Statistische Auswertung                                                                                                        | 28 |
| 4     | ERGEBNISSE                                                                                                                     | 29 |
| 4.1   | Pilotstudie                                                                                                                    | 29 |
| 4.1.1 | Ernährungsphysiologische Parameter                                                                                             | 29 |
| 4.1.2 | Arsen                                                                                                                          | 29 |
| 4.1.3 | Cadmium                                                                                                                        | 32 |
| 4.1.4 | Nickel                                                                                                                         | 34 |
| 4.1.5 | Blei                                                                                                                           | 35 |
| 4.2   | Zeitstudie                                                                                                                     | 37 |
| 4.2.1 | Wachstumsverlauf                                                                                                               | 37 |
| 4.2.2 | Metallkonzentrationen in der Niere                                                                                             | 38 |
| 4.2.3 | Arsengehalt der Blutzellen                                                                                                     | 42 |
|       | - Auswirkung des Restblutgehalts der Nierenrinde<br>auf die Arsenkonzentration in der Nierenrinde                              |    |
| 4.2.4 | Kupfergehalt in Leber, Mukosa und Blut                                                                                         | 45 |
| 4.2.5 | Gelchromatographie von Homogenatüberständen der<br>Nierenrinde und Metallgehalt der Fraktionen                                 | 45 |
| 4.2.6 | Untersuchung hitzedenaturierter Homogenatüberstände<br>an der HPLC sowie Rechromatographie von Fraktionen<br>der Gelfiltration | 48 |
| 4.2.7 | Disk-Elektrophorese von hitzedenaturierten<br>Homogenatüberständen                                                             | 49 |

|         |                                                                     |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3     | Urinuntersuchungen                                                  | 50 |
| 4.3.1   | Arsen- und Kupferausscheidung                                       | 50 |
| 4.2.2   | Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen<br>von Rattenurin | 53 |
| 4.3.3   | Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Urin                  | 54 |
| 4.4     | Rechnerische Kupferbilanzierung                                     | 54 |
| 5       | DISKUSSION                                                          | 56 |
| 5.1     | Pilotstudie                                                         | 56 |
| 5.1.1   | Cadmium                                                             | 56 |
| 5.1.1.1 | Organ- bzw. Gewebeverteilung                                        | 56 |
| 5.1.1.2 | Beurteilung der Cadmiumbelastung                                    | 57 |
| 5.1.1.3 | Interaktion von Cadmium und Eisen                                   | 57 |
| 5.1.1.4 | Einfluß von Cadmium auf Kupfer und Zink                             | 58 |
| 5.1.1.5 | Interaktion von Cadmium und Mangan                                  | 58 |
| 5.1.2   | Arsen                                                               | 59 |
| 5.1.2.1 | Organ- bzw. Gewebeverteilung                                        | 59 |
| 5.1.2.2 | Interaktion von Arsen und Kupfer                                    | 60 |
| 5.1.3   | Nickel                                                              | 62 |
| 5.1.3.1 | Essentielles oder toxisches Metall ?                                | 62 |
| 5.1.3.2 | Organverteilung                                                     | 62 |
| 5.1.3.3 | Interaktion von Nickel und Kupfer                                   | 62 |
| 5.1.3.4 | Interaktion von Nickel und Eisen                                    | 63 |
| 5.1.3.5 | Einfluß von Nickel auf Cadmium und Blei                             | 64 |
| 5.1.3.6 | Beurteilung der Nickelbelastung                                     | 64 |
| 5.1.4   | Blei                                                                | 64 |
| 5.1.4.1 | Organ- bzw. Gewebeverteilung                                        | 64 |
| 5.1.4.2 | Einfluß von Blei auf essentielle Metalle                            | 65 |
| 5.1.4.3 | Interaktion von Blei und Arsen                                      | 65 |



|         |                                                               |    |
|---------|---------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.5   | Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für den Menschen            | 65 |
| 5.2     | Zeitstudie                                                    | 67 |
| 5.2.1   | Metallkonzentrationen in der Niere                            | 67 |
| 5.2.1.1 | Arsenkonzentrationen                                          | 67 |
| 5.2.1.2 | Kupferkonzentrationen                                         | 67 |
| 5.2.1.3 | Cadmiumkonzentrationen                                        | 68 |
| 5.2.2   | Biochemische Untersuchung der Homogenatüberstände             | 68 |
| 5.3     | Urinuntersuchungen                                            | 71 |
| 5.3.1   | Arsen- und Kupferkonzentrationen                              | 71 |
| 5.3.2   | Nierenfunktion                                                | 72 |
| 5.4     | Hypothesen zur Ursache der Kupferanreicherung<br>in der Niere | 73 |
| 6       | ZUSAMMENFASSUNG                                               | 74 |
| 7       | LITERATURVERZEICHNIS                                          | 76 |

**TABELLENANHANG****LEBENS LAUF**

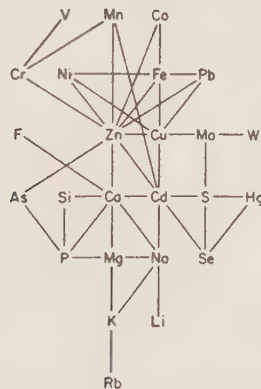
## ABKÜRZUNGEN

|         |                                                                   |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| A       | Absorption                                                        |
| AAS     | Atomabsorptionsspektrometrie                                      |
| Abb.    | Abbildung                                                         |
| AK      | Antikörper                                                        |
| AP      | Alkalische Phosphatase                                            |
| Bz      | Blutzellen                                                        |
| BSA     | Bovine Serum Albumin/Rinderserumalbumin                           |
| D       | Dalton                                                            |
| F.G.    | Feuchtgewicht                                                     |
| Gr.     | Gruppe                                                            |
| ICP-AES | Atomemissionsspektrometrie                                        |
|         | Anregung durch induktiv gekoppeltes Plasma                        |
| h       | hour/Stunde                                                       |
| LSD     | Least Significant Difference/Geringster signifikanter Unterschied |
| KD      | Kilodalton                                                        |
| M       | Arithmetisches Mittel                                             |
| Me      | Metall                                                            |
| MG      | Molekulargewicht                                                  |
| MT      | Metallothionein                                                   |
| n       | Versuchszahl                                                      |
| n.n.    | nicht nachweisbar                                                 |
| n.g.    | nicht gemessen                                                    |
| p       | Irrtumswahrscheinlichkeit                                         |
| s.      | siehe                                                             |
| SD      | Standard Deviation/Standardabweichung                             |
| SEM     | Standard Error of the Mean                                        |
|         | Standardfehler des Mittelwertes                                   |
| St      | Standard                                                          |
| r       | Korrelationskoeffizient                                           |
| RTL     | Rattenleber                                                       |
| Tab.    | Tabelle                                                           |
| TEMED   | Tetramethyl-Ethylen-Diamin                                        |
| Ve      | Elutionsvolumen                                                   |
| Vo      | Ausschlußvolumen                                                  |
| Vt      | Gesamtvolumen                                                     |



## 1 EINLEITUNG

Schon 1946, als in Japan als Folge einer chronischen Cadmiumvergiftung die sogenannte "Itai-Itai"- Krankheit auftrat, wurde deutlich, daß der Versorgung der Bevölkerung mit Mineral- und Spurenelementen bei dieser Intoxikation eine wichtige Rolle zukam. Ein Mangel an Calcium (1), Vitamin D und hochwertigem Eiweiß schien zumindest mitverantwortlich für die Schwere der Vergiftung zu sein. Der Grund für das gehäufte Auftreten der "Itai-Itai"- Symptomatik bei Frauen zwischen 40 und 70 Jahren, die mehrere Geburten hatten, war vermutlich auch ein mehr oder weniger ausgeprägter Eisenmangel (2). Den Nachweis der gesteigerten Resorption von toxischen Schwermetallen im Eisenmangelzustand erbrachten Pollack et al., 1965 (3) und Forth et al., 1966 (4). Seither wurden in der Literatur Interaktionen von toxischen Metallen sowohl mit Mineralstoffen (5), als auch mit essentiellen Spurenelementen beschrieben. Auch zwischen Spurenelementen gibt es Wechselwirkungen (6,7). Die Abbildung 1 demonstriert die Vielfalt der möglichen Interaktionen (8).



**Abb.1 : Mögliche Interaktionen von Elementen des Periodensystems bei der Resorption und Verteilung im Organismus**

Der Einfluß einzelner toxischer Metalle auf die Resorption, Verteilung und Retention eines essentiellen Metalls und umgekehrt der Effekt einzelner essentieller Spurenelemente auf die Resorption einzelner toxischer Metalle ist mannigfach untersucht worden (9-13).

Über die gleichzeitige Wechselwirkung mehrerer toxischer Metalle untereinander und mit mehreren essentiellen Metallen, wie sie unter gewöhnlichen Lebensbedingungen eher die Regel ist, gibt es dagegen nur wenige Daten (14). Derartige Untersuchungen sind von großer Bedeutung, sind doch Schwermetallbelastungen immer auf gleichzeitig mehrere Metalle, z.B. in der Nahrung, zurückzuführen.

Zwar sind diese unerwünschten Bestandteile nicht immer in gleichen Mengen und Proportionen in Lebensmitteln vorhanden, doch sollten auch Dosen nicht unterschätzt werden, die nicht akut toxisch sind, da zumeist eine chronische Zufuhr erfolgt. Die Beurteilung der Belastung des gesamten Organismus sollte nicht nur ausschließlich durch die Analyse der Gehalte von Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten erfolgen, auch die Kenntnis der Metallinteraktionen und ihrer Mechanismen ist hierzu erforderlich. In früheren Untersuchungen blieb es häufig bei der Beschreibung des Phänomens einer Interaktion, z.B. bei der Aufnahme in den Organismus oder in einzelne Organe.

Sicherlich sind Proteine, mit der Fähigkeit sowohl die essentiellen Metalle als auch toxische Schwermetalle zu binden, direkt oder indirekt am Auftreten solcher Wechselwirkungen beteiligt. Aber auch andere, niedermolekulare Liganden könnten eine Rolle spielen. Auch deren Identifizierung stellt einen ersten Schritt zur Aufklärung von Metallinteraktionen dar. Desweiteren sollte bei der Studie einer Interaktion, die sich in einem Organ bzw. Gewebe manifestiert, immer der gesamte Organismus mit seinen vielfältigen Möglichkeiten zur Reaktion auf äußere Einflüsse betrachtet werden. Wird z.B. eine Interaktion in der Leber festgestellt, also die Erhöhung oder Verminderung der Konzentration eines essentiellen Metalls nach Verfütterung eines toxischen, so ist es wichtig aufzuklären, welche Wirkung die Interaktion auf andere Organe bzw. Gewebe hat. Alle diese Bemühungen, Näheres über Metallinteraktionen zu erfahren, dienen dem Zweck, ihre Relevanz für den Menschen beurteilen zu können.

Für den Lebensmittelchemiker ist die Kenntnis von Metallinteraktionen bei der Resorption und Verteilung im Organismus dann unverzichtbar, wenn er auf dem Gebiet der Ernährungslehre und -beratung tätig ist.

Bei der Untersuchung und der Beurteilung von Lebensmitteln im Rahmen des Vollzugs des LMBG (Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetz) interessiert die Wirkung von toxischen Metallen auf das Gleichgewicht von essentiellen Metallen im Organismus.

Zwar ergaben z.B. serienmäßige Bestimmungen von Cadmium und Blei, durchgeführt vom Untersuchungsamt Gießen 1987 (15), im Muskelfleisch nur sehr geringe Werte, doch in Lebern und Nieren von Schweinen und Rindern wurden Konzentrationen gemessen, die die Richtwerte des Bundesgesundheitsamtes erreichten und sogar überschritten. Zieht man außerdem die lange biologische Halbwertszeit, z.B. von Cadmium mit über 28 Jahren, die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten und das gehäufte Auftreten eines Eisenmangels besonders bei Frauen in Betracht, so wird die Bedeutung des Schwermetallgehalts von Lebensmitteln für das Auftreten von Interaktionen mit essentiellen Metallen auch beim Menschen deutlich.

## 2 AUFGABENSTELLUNG

1. In einer Pilotstudie an Ratten sollten Interaktionen der toxischen Metalle Cadmium, Nickel, Blei, sowie des Halbmetalls Arsen und der essentiellen Spurenmetalle Kupfer, Eisen, Mangan und Zink untersucht werden. Mit Metallinteraktionen sind Änderungen der Metallgehalte in Organen bzw. Geweben im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gemeint.

Die gleichzeitige Verabreichung der vier toxischen Metalle in einer sogenannten Basisdiät war zur Simulation einer geringen Grundbelastung gedacht. Eine stufenweise Konzentrationserhöhung eines der ausgewählten toxischen Metalle in Testdiäten I-IV, bei unveränderter Konzentration der drei anderen, sollte eine erhöhte Belastung darstellen, bei der Interaktionen mit den essentiellen, aber auch mit den toxischen Metallen sichtbar werden sollten. Bei diesen Untersuchungen sollten die Metallkonzentrationen so gewählt werden, daß akute und auch schwere chronische Vergiftungen nicht auftreten. Neben der Leber, dem Stoffwechselorgan, und der Niere, dem Ausscheidungsorgan, sollten auch Darm, Blut, Knochen, Gehirn, Haut, Haare und Muskel in die Untersuchungen einbezogen werden. Im Gegensatz zu den toxischen Metallen finden sich die essentiellen Spurenmetalle nahezu im ganzen Körper, so daß sich eine Interaktion nicht nur in den bekannten Hauptzielorganen, Leber und Niere, sondern auch in anderen Geweben zeigen könnte.

2. Eine der in der Pilotstudie festgestellten Interaktionen sollte ausgewählt werden, um in einer Zeitstudie
  - a) die Entwicklung der Interaktion über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um Aussagen darüber machen zu können, ob es sich bei dieser Wechselwirkung um einen anhaltenden, vorübergehenden oder zunehmenden Effekt handelt.

- b) erste Erkenntnisse über den genaueren Ort der Interaktion und eventuell über den Mechanismus zu erhalten.
3. Abhängig von der ausgewählten Interaktion und dem Ort ihres Auftretens sollten Untersuchungen folgen, die weitere Rückschlüsse auf die Ursache der Wechselwirkung zuließen.
4. Da vor dem Start der Pilotstudie die Atom-Emissions-Spektrometrie mit Anregung durch ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP-AES) eine noch wenig verbreitete Methode zur Bestimmung von Metallen war, sollte sie in Verbindung mit dem gewählten Aufschlußverfahren auf Präzision und Reproduzierbarkeit hin überprüft werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Futterzusammensetzung

Grundlage aller Futtermischungen war die Kontrollldiät C 1000 der Firma Altromin (Lage). Neben den Kohlenhydraten mit 57% betrug der Proteingehalt 17%, der Fettanteil 5% und der Fasergehalt 3%. Der Rest setzt sich aus einer Vitaminmischung, einer Mineralsalzmischung und Wasser zusammen. Entscheidend für unsere Untersuchungen war der Metallgehalt. Die Konzentrationen der essentiellen Metalle Eisen, Kupfer, Mangan und Zink wurden als ausreichend für die Ernährung von Ratten angesehen (16). Eine Kontrolle der Herstellerangaben (Tab.1) ergab für uns, auch hinsichtlich toxischer Elemente, ein zufriedenstellendes Ergebnis; diese waren nur in technisch unvermeidbaren Mengen enthalten.

**Tab.1 : Analysen der Kontrollldiät C 1000**

M  $\pm$  SD (n = 12)

n.n. = nicht nachweisbar mit ICP-AES

| Element | Konzentration [mg Metall/kg Diät] |                 |
|---------|-----------------------------------|-----------------|
|         | Herstellerangabe                  | Kontrollanalyse |
| Arsen   | 0,044                             | n.n.            |
| Cadmium | -                                 | n.n.            |
| Nickel  | 0,002                             | n.n.            |
| Blei    | 0,376                             | n.n.            |
| Kupfer  | 12,2                              | 13,0 $\pm$ 3,0  |
| Eisen   | 180,1                             | 166,5 $\pm$ 9,0 |
| Mangan  | 100,8                             | 88,7 $\pm$ 16,7 |
| Zink    | 30,4                              | 35,5 $\pm$ 3,3  |

Diese Kontrollldiät wurde durch Zusatz der vier toxischen Metalle Arsen, Cadmium, Nickel und Blei in Form ihrer Salze, Natriumarsenit, Cadmiumchlorid, Nickelchlorid und Bleiacetat (Firma Merck, Darmstadt), modifiziert und ergab die sogenannte Basisdiät.

Für die einzelnen Testdiäten wurde jeweils ein toxisches Metall in steigender Menge der Basisdiät zugegeben, während die drei anderen in ihren Konzentrationen beibehalten wurden (Tab.2). Der Gehalt der Diäten an toxischen Metallen sollte so hoch wie nötig sein, um innerhalb einer 14-tägigen Fütterungsperiode Interaktionen feststellen zu können (Versuche) und so gering wie möglich, also weder akut noch chronisch toxisch (17).

**Tab.2 : Metallkonzentrationen in den 16 Testdiäten und der Basisdiät**  
Werte in mg Metall/kg Diät  
in Klammern eigene Analysenwerte für die Basisdiät  $M \pm SD$  (n=5)  
und für die Testdiäten  $M$  (n=3)

| Diät      | As                     | Cd                      | Ni                       | Pb                      |
|-----------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Basisdiät | 7,5<br>(7,3 $\pm$ 0,3) | 11,2<br>(8,6 $\pm$ 1,8) | 11,8<br>(12,5 $\pm$ 0,7) | 20,7<br>(19,7 $\pm$ 13) |
| As I      | 15,0 (16,1)            | 11,2                    | 11,8                     | 20,7                    |
| As II     | 30,0 (23,6)            | 11,2                    | 11,8                     | 20,7                    |
| As III    | 60,0 (56,3)            | 11,2                    | 11,8                     | 20,7                    |
| As IV     | 120,0 (89,4)           | 11,2                    | 11,8                     | 20,7                    |
| Cd I      | 7,5                    | 22,4 (18,5)             | 11,8                     | 20,7                    |
| Cd II     | 7,5                    | 44,8 (27,5)             | 11,8                     | 20,7                    |
| Cd III    | 7,5                    | 89,6 (73,1)             | 11,8                     | 20,7                    |
| Cd IV     | 7,5                    | 179,2 (181)             | 11,8                     | 20,7                    |
| Ni I      | 7,5                    | 11,2                    | 47,2 (54,9)              | 20,7                    |
| Ni II     | 7,5                    | 11,2                    | 94,4 (125)               | 20,7                    |
| Ni III    | 7,5                    | 11,2                    | 188,8 (219)              | 20,7                    |
| Ni IV     | 7,5                    | 11,2                    | 377,6 (365)              | 20,7                    |
| Pb I      | 7,5                    | 11,2                    | 11,8                     | 51,7 (52)               |
| Pb II     | 7,5                    | 11,2                    | 11,8                     | 103,4 (89)              |
| Pb III    | 7,5                    | 11,2                    | 11,8                     | 206,8 (226)             |
| Pb IV     | 7,5                    | 11,2                    | 11,8                     | 413,6 (394)             |

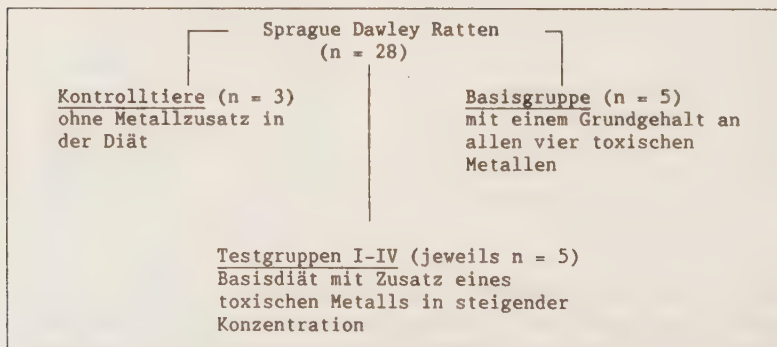
Zur Herstellung der Basisdiät und der Testdiäten für die Pilotstudie wurden die Salzmengen, die zum Erreichen der gewünschten Gehalte an toxischen Metallen nötig waren, abgewogen, gemischt und zur Herstellung und Pelletierung der Futtermischungen an Altromin geschickt. Von den

siebzehn verschiedenen Diäten wurden Stichprobenanalysen angefertigt (s. Tab.2). Die festgestellte inhomogene Verteilung der zugesetzten Metallsalze veranlaßte uns, für die Diäten der Zeitstudie das Herstellungsverfahren abzuändern. Vor dem Versand vermengten wir die abgewogenen Salzmischungen sorgfältig mit jeweils einem Kilogramm C 1000 in einer Porzellanschale. Die damit hergestellten Fertigdiäten wiesen eine wesentlich gleichmäßigere Verteilung der zugesetzten Metallsalze auf.

### 3.2 Durchführung der Tierexperimente

#### 3.2.1 Pilotstudie

Jeder der vier Versuchsansätze wurde nach dem Element benannt, das mit den entsprechenden Testdiäten I-IV in höherverdünnenden Konzentrationen verabreicht wurde. Pro Versuchsansatz erhielten 28 männliche Sprague Dawley Ratten (Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen) mit einem Anfangsgewicht von 90 g bis 120 g eine Woche die Kontrolldiät C 1000 und destilliertes Wasser ad libitum. Dieser Adaptionsphase in Edelstahlkäfigen folgte die Verteilung der 150 g bis 170 g schweren Ratten auf Glasstoffwechselkäfige (Abb.2).



**Abb. 2** : Einteilung der Versuchstiere für einen Versuchsansatz

Die Anzahl der Kontrolltiere pro Versuchsansatz war im Vergleich zur Basisgruppe und den Testgruppen verringert (statt  $n=5$  nur  $n=3$ ), da wir die Kontrolltiere aller vier Versuchsansätze für die Auswertung der Pilotstudie zu einer großen Kontrollgruppe ( $n=12$ ) zusammenfassen wollten.

Der Futter- und Wasserverbrauch wurden täglich, die Gewichtszunahme wöchentlich bestimmt. Nach zwei Wochen wurden die Tiere mit Äther narkotisiert. Nachdem das Abdomen geöffnet und die Aorta abdominalis freipräpariert war, wurde ein heparinisierter Teflonschlauch in die Aorta eingeführt, um die Tiere zu entbluten (-> Blutprobe). Auf diese Weise konnten 8 bis 11 ml Blut erhalten werden. Den toten Tieren wurden folgende Organe bzw. Gewebe entnommen: Leber, Nieren, Darm (12 cm langes Segment ausgehend vom Pylorus also hauptsächlich dem Duodenum entsprechend), Oberschenkelmuskel, Oberschenkelknochen, Haut, Haare und Gehirn. Bis auf die Haare und das Blut wurden alle Proben mit physiologischer Natriumchloridlösung gewaschen und sofort bei  $-30^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren (18,19). Um den Darminhalt zu entfernen, wurde der entnommene Darmabschnitt vor dem Einfrieren mit Natriumchloridlösung durchspült. Da wir die zellulären Blutbestandteile getrennt vom Plasma analysieren wollten, mußte das Vollblut zentrifugiert werden (1000xg, 15 min). Die Blutzellen wurden dreimal mit Natriumchloridlösung gewaschen, zentrifugiert und getrennt vom Plasma eingefroren. Die Haare fanden nach dreimaligem Waschen, abwechselnd mit Aceton p.A. und destilliertem Wasser, ohne Tiefkühlen für die Analyse Verwendung.

### 3.2.2 Zeitstudie

Angesichts der verlängerten Fütterungsperiode (bis 15 Wochen) wählten wir für diese Studie weibliche Sprague Dawley Ratten (KG:80 g bis 100 g). Die Adaptionphase verlängerten wir auf zwei Wochen. Danach wurden die Ratten wie bei der Pilotstudie in die verschiedenen Gruppen eingeteilt (Tab.3). Der verlängerte Fütterungszeitraum veranlaßte uns, einen Arsengehalt im Futter von 30 mg/kg als oberes Limit festzusetzen, um eine ernsthafte chronische Vergiftung der Tiere auszuschließen. Die

Zeitstudie wurde in Edelstahlkäfigen durchgeführt, da eine eventuelle Kontamination mit Nickel und Eisen durch die V<sub>2</sub>A Stahlkäfige nicht relevant war.

**Tab.3 : Einteilung der Tiere in verschiedene Gruppen und Fütterungszeiträume**  
Anzahl der Tiere pro Gruppe in einem Käfig

| 68 Sprague Dawley Ratten       |   |   |   |   |    |
|--------------------------------|---|---|---|---|----|
| Fütterungszeitraum<br>[Wochen] | 0 | 1 | 3 | 7 | 15 |
| → Kontrollgruppen              | 4 | 4 | 4 | 4 | 4  |
| → Basisgruppen                 |   | 4 | 4 | 4 | 4  |
| → AsI- Gruppen                 |   | 4 | 4 | 4 | 4  |
| → AsII-Gruppen                 |   | 4 | 4 | 4 | 4  |

Der Futter- und Wasserverbrauch konnte nicht hinreichend zuverlässig bestimmt werden. Die Gewichtskontrolle erfolgte wöchentlich, ab der dritten Woche 14- täglich. Nach den in Tab.3 angegebenen Zeit wurden die Tiere mit Nembutal (50 mg/kg KG i.p.) narkotisiert. Nach Öffnen der Bauchdecke wurden 0,1 ml Heparinlösung (Firma Braun, Melsungen) in die Vena cava inferior injiziert und anschließend sofort 2 ml Blut entnommen. Die Kanüle verblieb solange in der Vene, bis ein Teflonschlauch in die Vena portae eingeführt war, der an ein erhöht angebrachtes Vorratsgefäß mit Natriumchloridlösung (0,9 %) angeschlossen war. Die Perfusion aller inneren Organe erfolgte durch den hydrostatischen Druck gleichmäßig und schonend. Nach der Entnahme von Leber, Nieren und Duodenum trennten wir Nierenrinde und -mark, Mukosa von Muskelschlauch und Serosa. Alle gewaschenen Organe bzw. Organteile sowie Plasma und Blutzellen (Trennung siehe 3.2.1) wurden bis zur Analyse eingefroren aufbewahrt. Von der Nierenrinde einer Niere stellten wir vorher mit einem Glashomogenisator ein 20%iges Homogenat in einem Puffer her (50 mmol Tris-HCL + 100 mmol KCl/l, pH 7,5), (Firma Merck, Darmstadt).

### 3.2.3 Untersuchungen von Rattenurin

In Anlehnung an die Pilotstudie erhielten 15 männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Anfangsgewicht von 90 g - 110 g eine Woche die Kontrolldiät C 1000. Anschließend erfolgte die Einteilung in eine Kontroll-, in eine Basis- und in eine As-III Gruppe, die die entsprechenden Diäten und bidestilliertes Wasser ad libitum erhielten. Die Tiere wurden zu Beginn (0. Tag), nach 1, 2, 4, 8 und 14 Tagen 8 h (von 7 - 15 Uhr) in die Glasstoffwechselkäfige gesetzt, in denen sie nur Zugang zu Wasser hatten, um die Kontamination des Urin mit Futter zu vermeiden. Der Urin wurde durch Zusatz von 50 µl einer 5%igen Natriumazidlösung konserviert. Sonst erfolgte die Haltung der Ratten in Edelstahlkäfigen. Nach 14 Tagen wurden die Tiere wie unter 3.2.1 beschrieben getötet, die Nieren entnommen und eingefroren.

### 3.3 Metallanalytik

#### 3.3.1 Aufschluß der organischen Matrix

Um der Analyse mittels der ICP-AES und der AAS (s. 3.3.2) zugänglich zu sein, müssen die zu bestimmenden Metalle in homogenen Lösungen vorliegen. Daher ist es bei der Spurenelementbestimmung in Organen bzw. Geweben erforderlich, die organische Matrix zu zerstören, um die Metalle in Lösung zu bringen. Gebräuchliche Verfahren dafür sind die Trocken- und Naßveraschung in offenen und geschlossenen Systemen (Stoeppler M., Nürnberg H.W. in: Metalle in der Umwelt, Hrsg. Merian E., 20). Wir entschieden uns für einen Naßaufschluß in Druckbomben (Firma Berghof, Eningen; Modell: 14571, 50 ml, 200 bar, 250° C). Für alle Aufschlüsse, Verdünnungen und Reinigungsschritte wurde immer Salpetersäure suprapur verwendet (Firma Merck, Darmstadt). Nur der Urin wurde einem offenen Aufschluß unterworfen (15 min/ 80°C).

Die Probenmenge, die unter den angegebenen Bedingungen mit einem Milliliter Salpetersäure gerade vollständig aufgeschlossen wird, ist abhängig vom Gewebetyp. Wie wir in Vorversuchen feststellten, beanspruchen fettreiche Gewebe z.B. Haut, Hirn und Leber eine größere Menge an Oxidationsmittel zu einem vollständigen Aufschluß. Deshalb wurden von den verschiedenen Organen bzw. Geweben unterschiedliche Mengen in die Analyse eingebracht:

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Leber, Niere, Hirn,<br>Blutzellen | 250 - 300 mg                |
| Darm                              | 300 - 350 mg                |
| Muskel                            | 400 - 450 mg                |
| Haare                             | 100 - 120 mg                |
| Haut                              | 170 - 200 mg                |
| Knochen                           | 150 - 200 mg (ganzer Femur) |
| Plasma                            | 1 ml                        |
| Urin                              | 1 ml                        |

Die Proben, auf 0,1 mg genau gewogen, wurden in Teflongefäßen (Firma Berghof, Eningen) mit 1 ml 65%iger Salpetersäure versetzt und in den Druckbomben aufgeschlossen (170°C/2,5 h). Nach dem Öffnen ließen wir die Gefäße unter dem Abzug abrauchen und verdünnten die Proben anschließend auf 10 ml. Zum Verdünnen der Aufschlußlösungen, der Standards und zum Spülen aller Gefäße verwendeten wir bidestilliertes Wasser (Firma Millipore Waters, Eschborn). Bis zur Analyse bewahrten wir die Meßlösungen in, mit verdünnter Salpetersäure gespülten, Szintillationsgefäßen (Firma Zinsser, Frankfurt) im Kühlschrank auf (21).

### 3.3.2 Bestimmung der Metallkonzentrationen

#### 3.3.2.1 Atomemissionsspektrometrie

Die Atom-Emissions-Spektrometrie (AES) mit induktiv gekoppeltem Plasma (inductively coupled plasma, ICP) ist eine moderne und leistungsfähige Multielementmethode zur quantitativen Bestimmung von Metallen und Nichtmetallen (22). Ein aus drei konzentrischen Quarzrohren bestehender Brenner befindet sich in der Spule eines Hochfrequenzgenerators. Durch die Rohre läßt man Gas (z.B. Argon) strömen. Ein Funke hoher Energiedichte, der Teslafunke, initiiert die Ionisation und es entsteht ein Plasma mit einer Temperatur von 8000° K (23). Die Probenlösung wird zerstäubt und in das Plasma geleitet.

Die hohe Temperatur bewirkt die Anregung der enthaltenen Elemente und die Lichtemission. Ein Mono- bzw. Polychromator löst das elementcharakteristische Licht in Spektrallinien auf. Mittels Lichtverstärker werden die Intensitäten der Spektrallinien gemessen. Die Errechnung der Elementkonzentration durch ein Computersystem ist nach der Eichung leicht möglich.

Für unsere Messungen verwendeten wir ein Simultanspektrometer (Jarrell Ash, Atom Comp Series 800, Fisher Scientific Company, Waltham, USA), bei dem die Wellenlängen im Gegensatz zu einem sequentiellen Spektrometer fest eingestellt sind. Die Probenlösungen wurden dem Zerstäuber mit einer peristaltischen Pumpe (Firma Abimed, Düsseldorf) zugeführt. Die

Fördermenge betrug 1,3 ml/min. Vorteilhaft im Vergleich zur AAS ist die Möglichkeit, 20 Elemente gleichzeitig mit großer Empfindlichkeit, guter Präzision und Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Die Eichung erfolgte mit Multielementstandards (Spex Industries, Metuchen, USA), die vor der Verwendung mit Wasser und Salpetersäure verdünnt wurden, so daß die Konzentration aller Elemente 10 µg/ml und die Säurekonzentration 6,5% betrug. Die Messung der Intensitäten, die Zweipunkteichung und die Umrechnung der Intensitäten in Konzentrationen übernahm ein PDP 8a Computer (Digital Equipment Corporation, Maynard, USA).

### 3.3.2.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die AAS ist im Vergleich zur ICP-AES ein schon länger etabliertes Verfahren zur Analyse von Metallen, das aber bei weitem nicht den Probendurchsatz erreicht wie die ICP-AES, da die Elemente nicht simultan in der Meßlösung erfaßt werden können. Für jedes zu bestimmende Element wird eine spezielle Lampe benötigt und muß eine neue Eichung durchgeführt werden. Doch hatte die AAS ihren Einsatzbereich bei uns in den Fällen, in denen die Nachweisstärke der ICP-AES nicht ausreichend war, oder nur ein sehr geringes Probenvolumen (< 1 ml) zur Verfügung stand. Für unsere Untersuchungen kam ein Spektrometer von der Firma Perkin Elmer (Überlingen, Modell: 432) zum Einsatz. Alle Elemente wurden mit dem Graphitrohrsystem (Perkin Elmer, Modell: HGA 500) analysiert, bis auf Arsen, das mit dem Hydridsystem bestimmt wurde (Perkin und Elmer, Modell: MHS 1). Die Eichung erfolgte, wie bei der ICP-AES, mit Spex Multielementstandards und als Reduktionslösung diente eine 3%ige Natriumborhydridlösung (Firma Riedel- de Häen, Seelze) in Natronlauge (0,25 M/l). Im Reaktionsgefäß wurde Arsin aus den, mit Salzsäure (0,4 M/l) verdünnten, Proben entwickelt und mit einem Argonstrom in die Meßküvette geblasen. Die Nutzung der AAS beschränkte sich bei uns auf wenige Fälle, so z.B. auf Blei-, Nickel- und Arsenmessungen in der Pilotstudie und im Zeitversuch auf Kupfer-, Arsen- und Cadmiummessungen in den Fraktionen der Gelfiltration. In der nachstehenden Tabelle 4 sind die praktischen Nachweisgrenzen der ICP-AES und der AAS gegenübergestellt.

**Tab.4 : Nachweisgrenzen der AAS und der ICP-AES (Herstellerangaben)**  
 Werte in ng/ml Meßlösung und µg/g Feuchtgewebe, F.G. bei 270 mg  
 durchschnittlicher Gewebeeinwaage  
 Wellenlänge [nm]

| Element (λ)      | ICP-AES |           | AAS   |           |
|------------------|---------|-----------|-------|-----------|
|                  | ng/ml   | µg/g F.G. | ng/ml | µg/g F.G. |
| As (193,6)       | 41      | 1,52      | 0,03  | 0,0011    |
| Cd (228,8)       | 5       | 0,185     | 0,07  | 0,0026    |
| Ni (231,6/232,0) | 14      | 0,518     | 0,3   | 0,011     |
| Pb (220,3/283,3) | 46      | 1,70      | 1,0   | 0,037     |
| Cu (324,7)       | 6       | 0,222     | 0,5   | 0,018     |
| Fe (259,9/248,3) | 9       | 0,333     | 2,5   | 0,092     |
| Mn (257,6/279,5) | 4       | 0,148     | 0,7   | 0,026     |
| Zn (213,8)       | 5       | 0,185     | 5,0   | 0,185     |

### 3.3.3 Qualitätssicherung der Analysenergebnisse

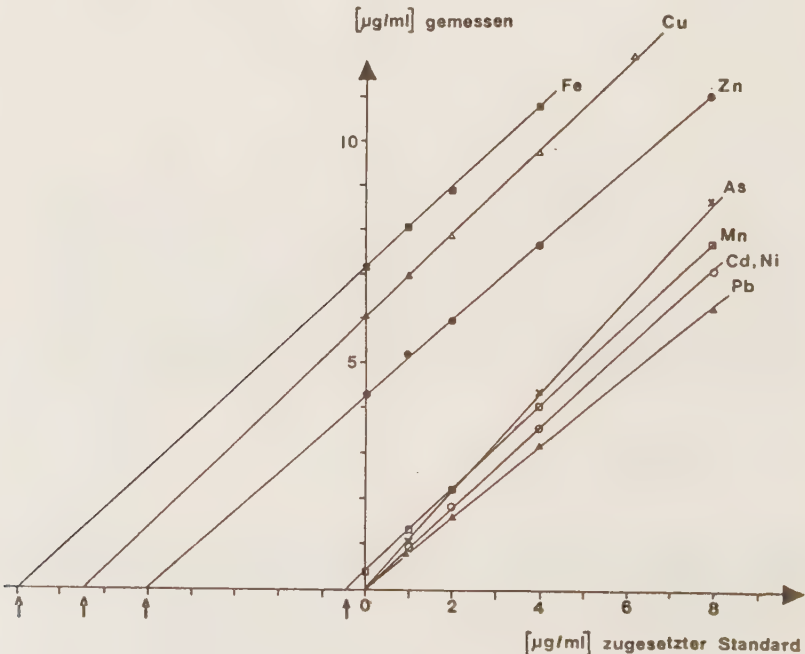
Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen, die sich mit dem Spurenelementgehalt von Organen und Geweben beschäftigen, doch oft ist kein Anhaltspunkt vorhanden, in wie weit die angegebenen Analysendaten plausibel sind (24). Die Quellen für fehlerhafte Ergebnisse sind mannigfaltig. Deshalb ist es von größter Wichtigkeit, den gesamten Analysenablauf einer strengen Qualitätskontrolle zu unterwerfen (25,26).

#### 3.3.3.1 Wiederfindung

Eine der besten Möglichkeiten, eine Analysenmethode auf Präzision und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, sind Wiederfindungsversuche. Die Standardadditionsmethode ist leicht und schnell durchführbar und gab uns erste Auskünfte über die Richtigkeit eigener Messungen mit Hilfe der ICP-AES .

Einer Lösung, die die zu bestimmenden Elemente enthielt, wurden Aliquote entnommen, mit steigenden Mengen eines Multielementstandards versetzt und auf 10 ml aufgefüllt. Die Säurekonzentration war auf

6,5% eingestellt und alle Lösungen wurden sechsmal an der ICP-AES gemessen. Die graphische Darstellung der Wiederfindung für die acht betrachteten Elemente zeigt Abb.3. Aus der Graphik läßt sich nicht nur die gute Linearität über den weiten Konzentrationsbereich ersehen, sondern auch der Gehalt der Stammlösung unter Berücksichtigung der Wiederfindung ablesen, falls dieser unbekannt war. Folgende Wiederfindungen konnten mit der Standardadditionsmethode ermittelt werden: As 109%, Cd 89%, Ni 91%, Pb 80%, Cu 92%, Mn 95%, Fe 90%, Zn 86%. Die Standardabweichungen lagen unter 1 %, mit Ausnahme von Arsen, bei dem sie 2% betrug.



**Abb.3** : Standardadditionsmethode

$M \pm SD$  (n=6)

Werte in  $\mu\text{g/ml}$  Me<sub>8</sub>Lösung (ICP-AES)

✕ Arsen, ○ Cadmium, ○ Nickel, ▲ Blei

△ Kupfer, ■ Eisen, □ Mangan, ● Zink

† Metallgehalt der Stammlösung incl. Wiederfindung

Bei dieser Methode gehen Fehler, die beim Organaufschluß auftreten, nicht in die Wiederfindung ein. Dazu war die Überprüfung des gesamten Analysenablaufes durch Standardmaterial mit zertifiziertem Gehalt notwendig. Hierfür verwendeten wir Leberpulver (National Bureau of Standards, Washington D.C., USA), das den Analysenbedingungen unterworfen wurde. Unsere Ergebnisse liegen, wie Tab.5 zeigt, innerhalb der angegebenen Toleranzgrenzen.

**Tab.5 : Analysen des Leberpulvers von National Bureau of Standards**

M  $\pm$  SD (n=6) für eigene Analysen

M  $\pm$  SD (n=6-12) für Sollwerte

Werte in  $\mu\text{g/g}$ , Messung mit ICP-AES oder AAS

- - = im Zertifikat nicht aufgeführt

n.n. = nicht nachweisbar, n.g. = nicht gemessen

| Element | Sollwert          | Analyse ICP-AES | AAS               |
|---------|-------------------|-----------------|-------------------|
| As      | 0,055 $\pm$ 0,005 | n.n.            | 0,073 $\pm$ 0,014 |
| Cd      | 0,270 $\pm$ 0,04  | n.n.            | 0,299 $\pm$ 0,012 |
| Ni      | - -               | n.n.            | n.n.              |
| Pb      | 0,340 $\pm$ 0,08  | n.n.            | n.g.              |
| Cu      | 193 $\pm$ 10      | 177 $\pm$ 1,0   | 186 $\pm$ 7,5     |
| Mn      | 10,3 $\pm$ 1      | 9,97 $\pm$ 0,13 | n.g.              |
| Fe      | 268 $\pm$ 8       | 262 $\pm$ 3,0   | n.g.              |
| Zn      | 130 $\pm$ 13      | 152 $\pm$ 9,8   | n.g.              |

Außerdem lag es in unserem Interesse aufzuzeigen, daß die Wiederfindung, bei den von uns gewählten Analysenbedingungen, weitgehend unabhängig vom Gewebetyp und der nach dem Aufschluß bestehenden Zusammensetzung der Meßlösung war. Die universelle Anwendbarkeit auf so unterschiedliche Proben wie z.B. Haut, Lebergewebe oder Plasma machte Untersuchungen unserer Ausmaße (ca. 2000 Einzelproben) erst möglich.

Kobalt, bei dem das Vorkommen in unbelasteten Geweben und die Kontaminationsgefahr zu vernachlässigen waren, erschien uns als Element für diese Überprüfung am besten geeignet. Eine Kobalt-Stammlösung mit 100  $\mu\text{g/ml}$  wurde hergestellt und pro Gewebetyp sechs Aufschlüsse unter Zusatz von

100 µl Kobaltstandard durchgeführt. Die Messung der Lösungen erfolgte an der ICP-AES. Als Blindwerte dienten Aufschlüsse mit 100 µl Standard, aber ohne Gewebe.

**Tab.6 : Wiederfindung in untersuchten Geweben  
von unbehandelten Sprague-Dawley Ratten**  
Werte in %,  $M \pm SD$  (n=6)  
BZ = Blutzellen

| Gewebe | Wiederfindung  |
|--------|----------------|
| Leber  | 95,8 $\pm$ 2,6 |
| Niere  | 94,2 $\pm$ 2,6 |
| Darm   | 97,3 $\pm$ 2,4 |
| Muskel | 95,1 $\pm$ 1,8 |
| Gehirn | 94,1 $\pm$ 1,2 |
| Haut   | 99,1 $\pm$ 1,7 |
| Plasma | 93,0 $\pm$ 1,8 |
| BZ     | 98,0 $\pm$ 0,9 |

### 3.3.3.2 Interelementstörungen

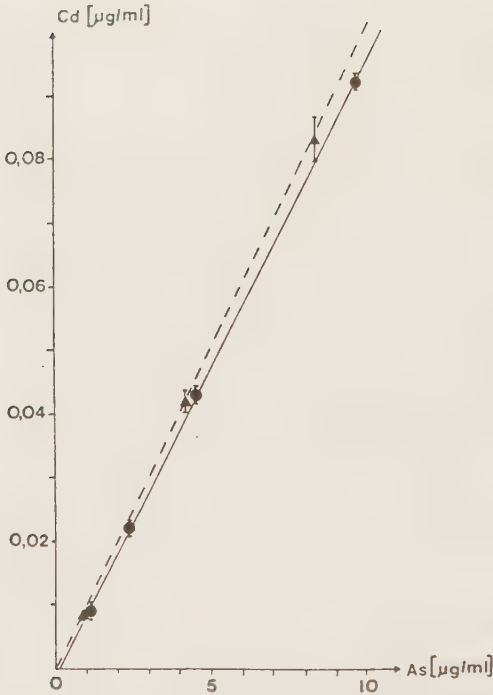
Wird ein Emissionsspektrum mit der ICP-AES aufgenommen, so kann es vorkommen, daß ein nachweislich vorhandenes Element die Registrierung eines nicht anwesenden Elements bewirkt. Ausführlich beschrieben sind solche Interferenzen in den "Line Coincidence Tables for ICP-AES" (27). Zur Prüfung, ob Interelementstörungen an unserem ICP-AES-Gerät auftreten, stellten wir Standardlösungen mit 100 µg/ml in 6,5% Salpetersäure (suprapur) folgender Elemente her: Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn und des weiteren Lösungen mit 1000 µg/ml von Ca, K, Mg, Na. Ausgenommen waren Co, Mo, Sb, Sn, Tl und Hg, da ihr mengenmäßiges Vorkommen in unseren Proben nicht ausreichte, um eine ernstzunehmende Interelementstörung zu bewirken, und damit eine Verfälschung der Analysenwerte der acht zu beobachtenden Metalle nicht zu erwarten war. Wir verwendeten pulverförmige Einzelelementstandards (suprapur; Firma Spex Industries, Metuchen, USA) mit Angaben über die Verunreinigungen in einem Zertifikat. Aus den Stammlösungen wurden Lösungen mit folgenden

Konzentrationen hergestellt und sechsmal gemessen : 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50 und 75 µg/ml.

Ziel der Untersuchung war es außerdem herauszufinden, ob zwischen steigenden Mengen eines nachweislich enthaltenen Elements und einem irrtümlich registriertem Element eine Korrelation bestand.

Folgende Interelementstörungen können festgehalten werden: As-Cd, Ni-Tl, Pb-As. Die vorgetauschten Elemente Cd, Tl und As werden in steigenden Mengen registriert. Der Effekt von Blei auf Arsen sei nur unter Vorbehalt genannt, da er sehr schlecht reproduzierbar war. Die tatsächliche Abwesenheit von Cadmium, Thallium und Arsen wurde durch Messung aller Verdünnungen an der AAS kontrolliert. Zusätzlich verglichen wir unsere Ergebnisse mit den "Line Coincidence Tables for ICP-AES" und fanden die Störungen As-Cd und Ni-Tl dokumentiert; Pb-As fehlte. Für uns war darüber hinaus von Interesse, ob und in welchen Ausmaßen diese Interelementstörungen auch in der Matrix einer aufgeschlossenen Leber auftraten. Dazu wurde eine ganze Rattenleber mit 65%iger Salpetersäure aufgeschlossen und die Aufschlußlösung 1:10 verdünnt. Dieser Pool diente zur Verdünnung der Einzelelementstandards (100 µg/ml verdünnt auf 10 µg/ml, 50 µg/ml verdünnt auf 5 µg/ml, 25 µg/ml verdünnt auf 2,5 µg/ml, 10 µg/ml verdünnt auf 1 µg/ml). Alle Lösungen wurden achtmal gemessen und die Resultate gemittelt. Aus dem natürlichen Gehalt an Cd, Tl und As des Rattenleberaufschlusses (sechsmal gemessen) konnte die Menge pro Milliliter Meßlösung errechnet werden, die von den Standardelementen vorgetauscht wurde (Tab.37, s. Tabellenanhang). Die Störungen As-Cd und Ni-Tl konnten in den gleichen Intensitäten wieder beobachtet werden; bei der Störung Pb-As bot sich eine Überraschung, da sie in der aufgeschlossenen Lebermatrix wesentlich besser reproduzierbar war, als in der verdünnten Säure.

Zu jeder Interelementstörung wurde eine Korrekturgerade, sowohl für die Rattenlebermatrix, als auch für die verdünnte Säure errechnet. Die Korrelationen für As-Cd und Ni-Tl waren sehr gut ( $r = 0,996 - 1,0$ ), für Pb-As in der aufgeschlossenen Rattenlebermatrix besser ( $r = 0,99$ ) als in Säure ( $r = 0,84$ ). Praktische Anwendung fand aber nur die Korrekturgerade für die As-Cd Störung (Abb.4) da Arsen in großen Mengen in unseren Proben vorhanden und auch Cadmium von Wichtigkeit war.



**Abb.4 : Interelementstörung As-Cd; Tatsächlich in der Meßlösung vorhandenes Arsen täuscht Cadmium in steigenden Mengen vor.**

M  $\pm$  SD (n=8)

-▲-▲- As-Standards in verdünnter Salpetersäure r=1,0

●-●- As-Standards in der Matrix einer aufgeschlossenen

Rattenleber r=0,996

### 3.3.3.3 Kontamination

- Abschätzung ihrer Bedeutung für die vorliegenden Studien

Wie schon unter 3.3.3 erwähnt, gibt es viele Fehlerquellen bei der Durchführung von Spurenelementanalysen. Die Kontaminationsgefahr hängt stark von den individuellen Versuchsbedingungen ab, ist also nicht vorhersehbar und zählt damit zu den bedeutendsten Ursachen für falsche Analysenwerte. Deshalb haben wir dieser Problematik große Aufmerksamkeit gewidmet.

Alle Gefäße und Reagenzien wurden in Glas- oder Styroporbehältern möglichst staubfrei aufbewahrt, um eine Kontamination mit As, Zn und Pb (28) zu vermeiden. Eine Kontamination des Probenmaterials mit Fe, Ni, Cr und Mn ist vermeidbar durch Verwendung von Glasstoffwechselkäfigen, Quarz- und Teflonbesteck, Teflonschläuche zum Entbluten und Reagenzien von größtem Reinheitsgrad. Der Verzicht auf gepuderte Handschuhe ist unerlässlich (Zn!). Der Reinigung der Teflongefäße und Meßkolben nach einem Aufschluß kam auch sehr große Bedeutung zu. Folgende Reinigungsschritte wurden durchlaufen: 1. Spülen mit Mucasol, einem spurenelement-armen Tensid (Firma Neumann, München), 2) Spülen mit Leitungswasser und Aqua bidest (Millipore Waters, Eschborn) 3. einen Tag in 6,5 % Salpetersäure stehenlassen, und 4. Spülen mit Aqua bidest und trocknen. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen mußten wir immer mit einer unvermeidbaren, geringen Kontamination rechnen und führten deshalb immer Blindproben mit d.h. ein Milliliter Salpetersäure suprapur durchlief das gesamte Analysenverfahren.

**Tab.7 : Durchschnittlicher Metallgehalt von Blindproben nach Durchlaufen des Analysenverfahrens**

Werte in  $\mu\text{g/ml}$  Meßlösung

$M \pm SD$  ( $n=20$ ), Messung mit ICP-AES

n.n. = nicht nachweisbar

| Element | Konzentration     |
|---------|-------------------|
| Arsen   | n.n.              |
| Cadmium | n.n.              |
| Nickel  | n.n.              |
| Blei    | n.n.              |
| Kupfer  | $< 0,006$         |
| Eisen   | $0,040 \pm 0,021$ |
| Mangan  | n.n.              |
| Zink    | $0,020 \pm 0,009$ |

Ausgehend von der durchschnittlichen, unvermeidbaren Kontamination (Tab.7) versuchten wir die Bedeutung für unsere Untersuchungen abzuschätzen (Tab.8).

**Tab.8 : Abgeschätzter prozentualer Fehler bei Eisen- und Zinkanalysen für unterschiedlichen Gewebetypen bezogen auf den Metallgehalt dieser Gewebe von Kontrolltieren**  
Angenommene Einwaagen wie unter 3.1.1

| Gewebe/Organ | Fehler % |      |
|--------------|----------|------|
|              | Eisen    | Zink |
| Leber        | 1        | 2    |
| Niere        | 2        | 2    |
| Darm         | 5        | 4    |
| Muskel       | 10       | 5    |
| Gehirn       | 8        | 5    |
| Blutzellen   | < 1      | 10   |
| Plasma       | 10       | 20   |
| Haut         | 25       | 10   |
| Haare        | 30       | 1    |
| Knochen      | 3        | 1    |

Probleme brachte die Kontamination nur für die Analyse von Plasma, Haut Haare, und Muskel, da der natürliche Gehalt an Eisen und Zink niedrig ist, und deshalb auch geringe Verunreinigungen zu einer sehr hohen Fehlerquote führten. So liegt der durchschnittliche Zinkgehalt im Plasma bei  $1,20 \pm 0,14$  (SD)  $\mu\text{g/ml}$ . Bei einer Kontamination mit  $0,02 \mu\text{g/ml}$  Meßlösung (insgesamt 10 ml) ergibt sich der prozentuale Fehler von ca. 20%. In Anbetracht dieser Fehlerabschätzungen mußten z.B. Cd-Fe-Wechselwirkungen in ihren Ausmaßen mindestens den abgeschätzten Fehler über- treffen, um Berücksichtigung zu finden.

### 3.4 Gelchromatographie

Die Gelchromatographie dient außer zur Isolierung auch zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen (29). In der Toxikologie wird sie darüberhinaus zur Erstellung von Proteinprofilen verwendet.

#### 3.4.1 Vorbereitung und Eichung der Säule

Fraktogel TSK 55 (S) wurde im Elutionspuffer (0,05 M Tris-HCl + 0,1 M KCl/l, pH 7,5) entgast und zur Packung in eine Säule 2 cm x 100 cm gefüllt (30,31). Nach Equilibrierung mit einer Flußgeschwindigkeit von 8 ml/h wurden zur Eichung der Säule folgende Referenzsubstanzen in Puffer gelöst und aufgetragen: Dextran Blau 2000 zur Bestimmung des Ausschlußvolumens, Ferritin, Aldolase, Albumin, Myoglobin und Vitamin B<sub>12</sub>. Mit einer Photozelle (Uvicord II: Firma LKB, Stockholm) konnten die Peaks registriert werden (Schreiber: Firma LKB).

Das Elutionsverhalten der Proteine bei der Gelchromatographie wird durch den Verteilungskoeffizienten K<sub>d</sub> charakterisiert:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

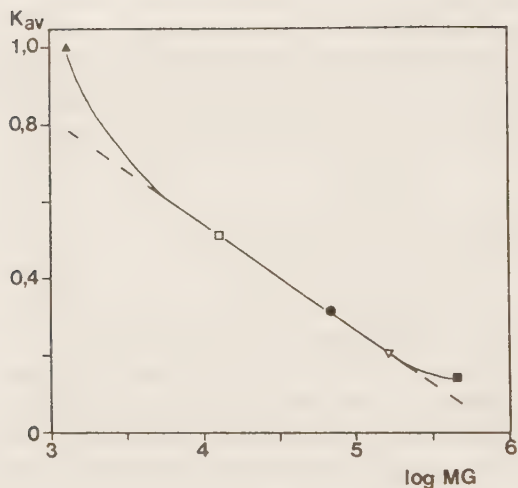
(V<sub>e</sub> = Elutionsvolumen, V<sub>o</sub> = Ausschlußvolumen, V<sub>i</sub> = inneres Volumen der Gelphase)

Anstelle von K<sub>d</sub> führten Laurent und Killander (32) die Konstante K<sub>av</sub> mit V<sub>i</sub> = V<sub>t</sub> - V<sub>o</sub> ein:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

(V<sub>t</sub> = Gesamtvolumen)

Trägt man logarithmisch die Molekulargewichte der Referenzproteine gegen ihre K<sub>av</sub>-Werte auf, so erhält man eine Gerade, die zur Bestimmung der Molekulargewichte unbekannter Proteine herangezogen werden kann.



**Abb. 5 : Abhängigkeit des  $K_{av}$ - Wertes vom Molekulargewicht**

Methode : Gelchromatographie (2,0/100 cm)  
 Stationäre Phase : Fraktogel TSK 55 (S)  
 Mobile Phase : Tris-HCl 0,05 M + KCl 0,1 M/l; pH 7,5  
 Durchfluß : 8 ml/h  
 Detektion : UV 280 nm  
 Eichproteine : Dextranblau 2.000.000 D zur Bestimmung von  $V_0$   
                   ■ Ferritin 450.000 D  
                   ▽ Aldolase 158.000 D, ● Albumin 68.000 D  
                   □ Cytochrom C 12.500 D, ▲ Vitamin B<sub>12</sub> 1.300 D

### 3.4.2 Protein- und Metallprofil der Nierenrinden

Die tiefgekühlten Nierenrindenhomogenate (s. 3.2.2) wurden bei 4°C aufgetaut und in einer Ultrazentrifuge (Firma Beckmann, Modell L3-50, München) zentrifugiert (100.000 x g/4°C/1 h). Von dem erhaltenen Überstand wurde 1 ml auf die Säule gegeben. Der restliche Überstand und das Pellet dienten der Metallanalytik mittels ICP-AES und AAS. Die Elutionsbedingungen waren mit denen der Eichung der Säule identisch. Fraktionen von 1,5 ml wurden gesammelt. Sofort nach Erhalt der Fraktionen erfolgte deren Ansäuerung mit je 160 µl Salpetersäure und danach die quantitative Bestimmung der Metalle.

### 3.5 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Gelchromatographie mittels der HPLC stellt eine weitaus empfindlichere und zeitsparendere Methode zur Proteintrennung mit wesentlich besserem Auflösungsvermögen dar.

Auf Grund der Ergebnisse der Gelfiltration mit anschließender Metallbestimmung in den Fraktionen (s. 4.2.5.) waren Anhaltspunkte vorhanden, die die Vermutung zuließen, daß das vermehrte Kupfer in der Nierenrinde an Metallothionein (MT) gebunden vorlag. Hierbei handelt es sich um ein weitgehend hitzestabiles Protein ohne aromatische Aminosäuren (33). Hitzedenaturierte Überstände (85°C, 8 min; 20.000xg, 15 min) der Nierenrindenhomogenate, die 1:4 mit Elutionspuffer verdünnt worden waren, um in den optimalen Meßbereich zu kommen, wurden mittels einer Säule TSK G 3000 SW analysiert (Firma LKB, Stockholm, Schweden). Durch den Hitzeschritt wurden höhermolekulare und hitzelabile Proteine abgetrennt. Die Proteinpeaks wurden bei 250 nm, nicht bei 280 nm detektiert. Die HPLC Pumpe Modell 300B und der UV Detektor SP-4 stammten von der Firma Gynkotheek (Germering). Eluiert wurde isochratisch mit einem Puffer aus Tris-HCl 0,1 M/l, pH 6,8 bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,48 ml/min und einem Druck von 48 bar. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Zur Chromatographie verwendeten wir gereinigtes Rattenleber-Metallothionein (Firma Sigma, Heidelberg).

### 3.6 Vertikale Disk-Elektrophorese

Zur weiteren Identifizierung der Homogenatüberstände wurden elektrophoretischen Trennungen nach den Angaben von Gabriel (34) vorgenommen. Aufgetragen wurden hitzedenaturierte Homogenatüberstände. Der Elektrodenpuffer bestand aus Glycin 0,4 M/l und Tris 0,05M/l, pH 8,3. Über die zylindrischen Glasröhrchen (0,6 cm x 10 cm) floß ein Strom von 4 mA (pro Gel). Nach ca. 2,5 Stunden wurden die Proteinbanden in 10 % TCA fixiert und mit 1% Amidoschwarz in einem Gemisch aus Eisessig: Methanol: Wasser = 1:3:5 gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit einer Mischung aus Eisessig:Methanol:Wasser = 1:1,4:15.

| Lösung                                                   | pH  | Zusammensetzung             | in 100 ml Lösung           |
|----------------------------------------------------------|-----|-----------------------------|----------------------------|
| A                                                        | 8,9 | HCl 1 M<br>Tris<br>TEMED    | 48 ml<br>36,6 g<br>0,23 ml |
| B                                                        |     | Acrylamid<br>Bis            | 28 g<br>0,735 g            |
| C                                                        |     | Ammoniumperoxo-<br>disulfat | 0,140 g                    |
| D                                                        |     | Acrylamid<br>Bis            | 10 g<br>2,5 g              |
| E                                                        |     | Riboflavin                  | 4,0 g                      |
| F                                                        | 6,9 | HCl 1 M<br>Tris<br>TEMED    | 48 ml<br>5,98 g<br>0,46 ml |
| Trenngel : 1 Teil A, 2 Teile B, 1 Teil Wasser, 4 Teile C |     |                             |                            |
| Sammelgel: 1 Teil F, 2 Teile D, 1 Teil " , 4 Teile E     |     |                             |                            |

### 3.7 Mancini-Test

Der Mancini-Test dient zur semiquantitativen Bestimmung von Antigenen (35). In unserem Fall konnte mit ihm die Blutverunreinigung der Niere, also die Qualität der Nierenperfusion, überprüft werden. Ein spezifischer, gegen Erythrozytenstroma von Ratten gerichteter Antikörper (Cooper Biomedical, Malvern, USA, Kat.Nr. 0113/1322) befand sich in einem Agargel (AK 2% in 1% Agar in Veronalpuffer 0,02M/l). Das Antigen, d.h. das Restblut in den Nierenrindenhomogenaten wurde in Verdünnungen 1:3, 1:4 und 1:8 in Digitoninlösung (0,13%) in die vorbereiteten Gel-löcher pipettiert und in einer feuchten Kammer über Nacht der Diffusion überlassen. Nach 6-stündiger Wässerung erfolgte die Färbung der Präzipitatringe mit 0,7%iger Coomassie Blue Lösung und die Entfärbung der Gelmatrix mit einem Gemisch aus Ethanol:Eisessig:Wasser = 3:1:5. Die Ermittlung einer Eichgerade mit verdünntem Rattenblut (0,5 µg - 4 µg) in Digitoninlösung) läßt eine Abschätzung der Blutverunreinigung der Nierenrinden aus dem Quadrat der Ringdurchmesser zu.

### 3.8 Urinuntersuchungen

SDS-Elektrophoresen dienten zur Überprüfung der Nierenfunktion hinsichtlich der glomerulären Filtration. Im Urin enthaltene Proteine werden bei der SDS-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch läßt sich eine vermehrte Ausscheidung von höhermolekularen Proteinen nachweisen.

Jeweils ein Milliliter Urin wurde 18 h bei 4°C gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und anschließend in Centricon 10 (Amicon, Witten) 1,5 h bei 4°C konzentriert. Das Volumen der Dialysate und der Konzentrate wurde gemessen. Die Hälfte des Konzentrats wurde mit gleichem Teil Probenpuffer gemischt, 4 min gekocht und ein Drittel davon aufgetragen. Die elektrophoretischen Trennungen erfolgten nach Laemmli et al., (36):

Probenpuffer : 1,5% Tris, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercatoethanol  
0,002% Bromphenolblau, pH 6,8

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bismethylenacrylamid

Trenngelpuffer: 23% Tris, 0,5% SDS, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 7,5% Tris, 0,5% SDS, pH 6,8

Elektrodenpuffer : 0,3% Tris, 1,4% Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

Trenngel (10%): 10 ml Acrylamidlösung, 6 ml Gelpuffer, 14 ml Wasser,  
10 µl TEMED, 30 mg Ammoniumpersulfat

Sammelgel (3%): 1 ml Acrylamidlösung, 2 ml Gelpuffer, 7 ml Wasser,  
3 µl TEMED, 10 mg Ammoniumpersulfat.

An das vertikale Flachbettgel wurde eine Spannung von 1,2 mV angelegt und die Stromstärke betrug 4,5 mA.

Fixierung : 25% Isopropanol, 10% Eisessig

Färbung : 0,1% Coomassie Blue, 10% Eisessig, 25% Methanol

Entfärbung: 5% Methanol, 14% Eisessig

Von den erhaltenen Dialysaten wurden vor der Konzentrierung 10% abgenommen und 100 µl davon dienten zur Aktivitätsbestimmung der AP. Der Test wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Analysenverfahrens, Merckotest 3344 (Firma Merck, Darmstadt), durchgeführt.

### 3.9 Statistische Auswertung

Da die Versuchszahl teilweise unterschiedlich war, wurde in diesen Fällen der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) anstelle der Standardabweichung (SD) angegeben.

Alle Daten wurden mit Hilfe der Varianzanalyse und anschließend mit dem LSD (Least Significant Difference)-Test ausgewertet. Als Signifikanzniveaus wurden  $p=0,05$  oder  $p=0,10$  gewählt d.h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% oder 10%. Außerdem erfolgte mit den Werten der Pilotstudie eine Korrelationsanalyse. Alle Tests und die dazugehörigen Tabellen wurden entnommen aus Sachs: "Angewandte Statistik" (37).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Pilotstudie

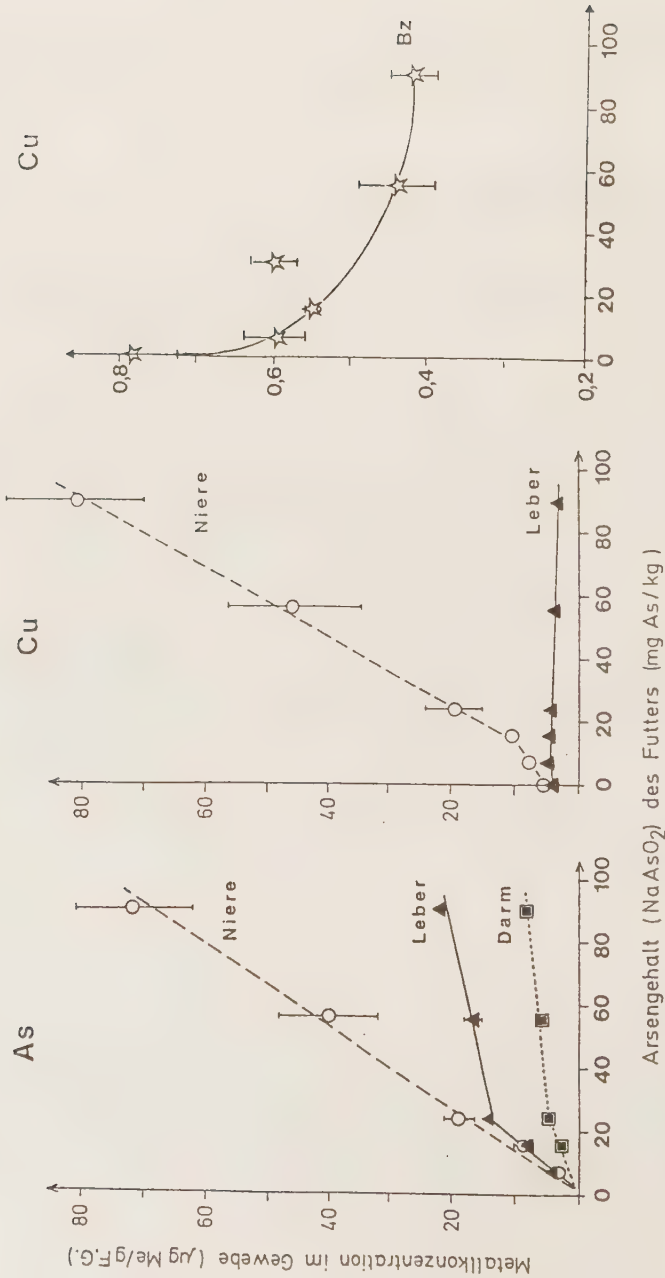
#### 4.1.1 Ernährungsphysiologische Parameter

Die Bestimmung des täglichen Futter- bzw. Wasserverbrauchs und die wöchentliche Gewichtskontrolle der Tiere dienten als äußere Hinweise zur Klärung der Frage, ob nach zwei Wochen die Metallkonzentrationen in den Diäten tatsächlich nicht eine akute Intoxikation bewirkten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und den Basis- bzw. Testgruppen im Futter- und Wasserverbrauch bestand nicht (Tab.33). Auch in der wöchentlichen Gewichtszunahme ließ sich kein Effekt der steigenden Schwermetалldosen erkennen (Tab.33). Eine Ausnahme machten hier die Tiere der Testgruppen Ni-III und Ni-IV (219 mg Ni/kg und 365 mg Ni/kg Diät), bei denen in der ersten Woche eine geringere Körpergewichtszunahme zu verzeichnen war, als bei den übrigen Gruppen.

Das einheitliche Bild des Wachstumsverlaufs, sowie der Nahrungs- und Wasseraufnahme kann als Indiz dafür gewertet werden, daß die nachfolgend beschriebenen Interaktionen ihre Ursache nicht in der toxischen Wirkung der verabreichten Schwermetalle hatten, sondern Ergebnisse "normaler" physiologischer Reaktionen waren. Da Kot und Urin nie vollständig getrennt werden konnten, und zudem ständig mit Futter kontaminiert waren, verzichteten wir auf ihre mengenmäßige Bestimmung und auch auf die Metallanalysen.

#### 4.1.2 Arsen

Eine Erhöhung des Arsengehalts in den Diäten verursachte in den drei inneren Organen Leber, Niere und Darm einen signifikanten Anstieg der Arsenkonzentrationen. Dabei reichte schon die Basisdiät aus, um in Leber und Niere Arsenkonzentrationen zu erzielen, die mit der ICP-AES gut meßbar waren (Nachweisgrenze 1,52 µg/g F.G.).



**Abb. 6 :** Veränderung der Arsen- und Kupferkonzentrationen in Organen und Blutzellen von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt Werte in µg/g F.G.:  $\bar{M} \pm \text{SEN}$  (n=5);  $p < 0,05$ ,  $r = 0,997-0,871$   
Bz = Blutzellen, Zahlenwerte siehe Tabellenanhang Tab.11+12

In der Leber und im Darm ließ sich bei den Diäten As-III und As-IV eine asymptotische Annäherung an einen maximalen Wert erkennen, während in der Niere ein linearer Zusammenhang von Futter- und Gewebekonzentration über den gesamten Bereich vorlag (Abb.6). In der Leber erhöhte sich der Arsengehalt von der Basisgruppe bis zur As-IV Gruppe um den Faktor 5, für die Niere betrug dieser 20 und für den Darm ca. 6. Damit spiegelte die Niere im Vergleich zur Leber und zum Darm eine erhöhte Arsenbelastung am deutlichsten wieder. Trotz des sehr geringen Arsengehalts der Kontroll-diät (0,044 mg/kg Diät), der unter der Nachweisgrenze von der ICP-AES lag, zeigten die Analysen der Blutzellen schon nach Verfütterung der Kontrolldiät gut erfaßbare Arsenmengen, die, ähnlich wie in Leber und Darm, mit steigendem Arsengehalt der Diät einem maximalen Wert zustreben. Im Plasma war erst nach Verabreichung der Diäten As-III und As-IV eine für die ICP-AES nachweisbare Konzentration vorhanden. Andere Probenmaterialien wie Gehirn, Knochen und Muskel wiesen ebenfalls eine Gewebesättigung auf. In den Haaren traten mit der ICP-AES meßbare Arsenkonzentrationen erst ab der As-III Diät auf und verdoppelten sich bei Gabe der As-IV Diät.

Interaktionen von Arsen mit anderen toxischen Metallen konnten nicht nachgewiesen werden. Eine scheinbare As-Cd-Interaktion in Geweben mit sehr hohem Arsengehalt und in den Blutzellen beruhte auf der As-Cd-Inter-elementstörung, bei der Cadmium mit steigender Arsenkonzentration in der Meßlösung zunehmend vorgetäuscht wurde. Auf Grund der ermittelten Inter-elementstörung (siehe 3.3.4) konnte, mittels einer vorher bestimmten Korrektur, eine As-Cd-Wechselwirkung in Leber, Niere und in den Blutzellen ausgeschlossen werden.

Einflüsse des Arsens auf essentielle Metalle betrafen hauptsächlich Kupfer, und hierbei besonders hervorzuheben ist die Interaktion von Arsen und Kupfer in der Niere. Sie äußerte sich in einem, linearen, bis zu 20-fachen Anstieg der renalen Kupferwerte, der streng mit der steigenden Arsenkonzentration im Futter korreliert war. Mit diesem Befund ging die Reduktion der Kupfergehalte in der Leber ab der As-III Gruppe um bis zu 20%, im Plasma und in den Blutzellen um bis zu 25-30% einher, wobei dieser Effekt im Plasma sehr schwach ausgeprägt war, d.h. die sinkenden Kupferwerte korrelierten schlecht mit den verfütterten Arsenmengen.

Außerdem trat eine Verminderung der Mangankonzentration im Darm um bis zu 50% ab der As-III Diät ein.

#### 4.1.3 Cadmium

Die inneren Organe Leber, Niere und Darm stellten die Hauptzielorgane für Cadmium dar, in denen schon ab der Basisdiät Cadmium mit der ICP-AES gut zu erfassen war (Nachweisgrenze: 0,185 µg/g F.G.). Einem linearen Cadmiumanstieg in Leber und Niere mit zunehmendem Cadmiumgehalt in der Diät stand eine Sättigung des Cadmiumgehalts im Darms gegenüber, die ab der Cd-II Gruppe deutlich wurde. In Bezug auf die Basisgruppe konnte bei der Cd-IV Gruppe ein Cadmiumanstieg in der Leber um das 30-fache, in der Niere um das 10-fache und im Darm um das 6-fache beobachtet werden. In den Blutzellen verdoppelten sich die Cadmiumwerte ausgehend von der Basisgruppe bis zur Cd-IV Gruppe.

Interaktionen mit Arsen, Nickel oder Blei ergaben sich nicht.

Dagegen ließen sich vielfach Einflüsse des Cadmiums auf essentielle Metalle feststellen.

So führte die Steigerung der Cadmiumkonzentration in den Diäten zu einer Reduktion der Eisenwerte und zwar nicht nur in Organen bzw. Geweben, in denen Cadmium nachweisbar war, wie in der Leber und im Darm um bis zu 50%, sowie in der Niere um bis zu 30%, sondern auch in der Haut um bis zu 45% und im Knochen um bis zu 30% (Abb.7) Die Bluteisenkonzentrationen waren jedoch nicht verändert.

Weitere Interaktionen von Cadmium mit essentiellen Metallen waren in der Leber, im Knochen und im Darm erkennbar. So führte die Erhöhung des Cadmiumgehalts im Futter zu einem bis zu 20%igen Anstieg der Zinkkonzentration in der Leber und zu einer bis zu 30%igen Reduktion im Knochen wobei diese Veränderungen aber erst ab der Cd-III Gruppe deutlich wurden. Außerdem verminderte sich die Mangankonzentration im Darm von der Basisgruppe bis zur Cd-IV Gruppe um bis zu 40% (s.Tabellenanhang Tab.14+15).

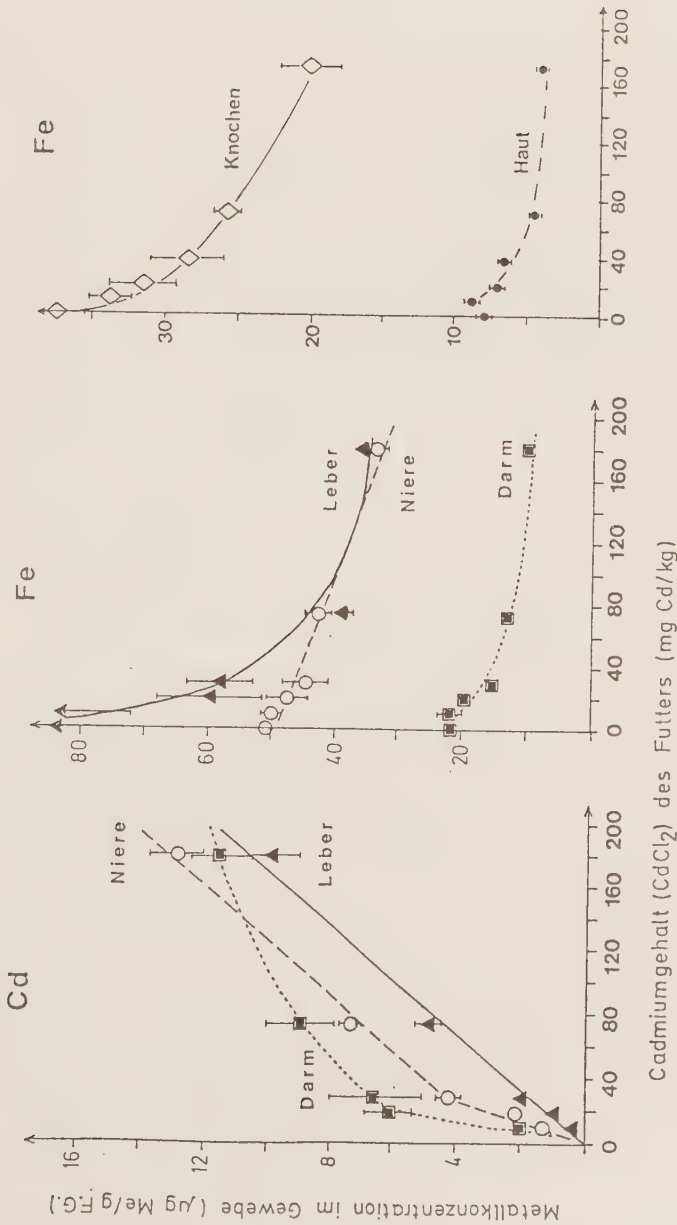


Abb. 7 : Veränderung der Cadmium- und Eisenkonzentrationen in Organen und Geweben von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Cadmiumgehalt Werte in µg/g F.G; M ± SEM (n=5); p<0,05; r=0,993-0,852 Zahlenwerte siehe Tabellenanhang Tab.14 + 15

#### 4.1.4 Nickel

Im Gegensatz zum Arsen und Cadmium bewirkte die Basisdiät noch keine Nickelkonzentrationen in Organen oder im Blut, die mit der ICP-AES meßbar waren (Nachweisgrenze: 0,518 µg/g F.G.). Wie in Vorversuchen festgestellt wurde, werden dazu ca. 50 mg Ni/kg Diät benötigt. Da wir jedoch nicht schon in der Basisdiät ein Übergewicht eines toxischen Metalls akzeptieren wollten, entschieden wir uns beim Nickel für eine dem Arsen und dem Cadmium vergleichbare Konzentration von 11,8 mg/kg Diät und wollten zur Messung der Aufschlußlösungen auf die AAS ausweichen. Das brachte nur für die Niere den gewünschten Erfolg, d.h. innerhalb der Basisgruppe war Nickel auch mit der AAS nur in der Niere nachzuweisen.

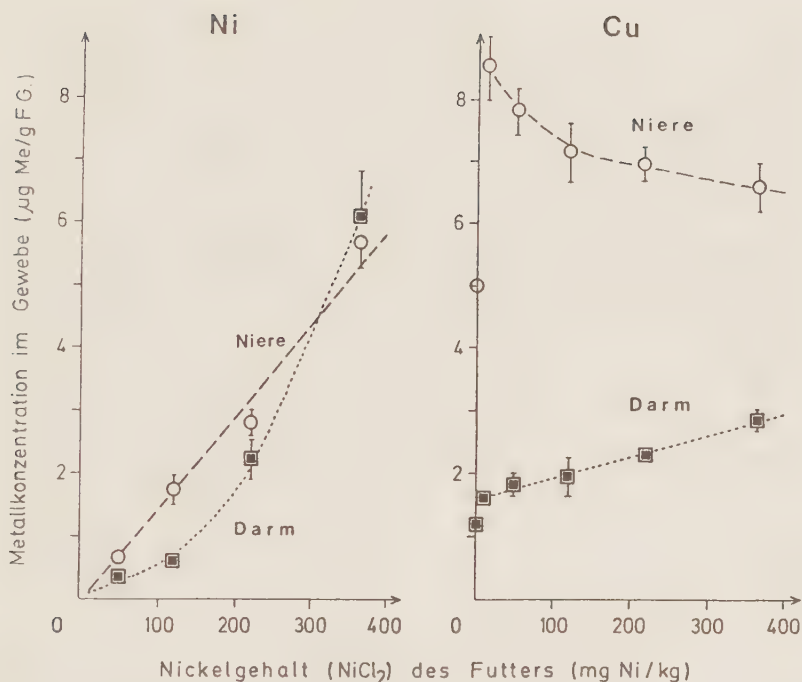
Eine Nickelanreicherung ergab sich für die Niere und den Darm, wobei in der Niere ein linearer, bis zu 10-facher und im Darm ein exponentieller bis zu 17-facher Anstieg zu erkennen war. Weder in der Leber, noch in anderen Untersuchungsmaterialien war Nickel nachweisbar.

Interaktionen mit den anderen toxischen Metallen traten in der Niere und im Darm auf. Nachdem wir schon mit der ICP-AES vereinzelt Blei in den Nieren der Ni-III und Ni-IV Gruppen nachweisen konnten, wurden alle Nierenproben dieses Versuchsansatzes mit Hilfe der AAS nachgemessen. Als Ergebnis konnte ein leichter Bleianstieg nach steigenden Nickelgaben festgehalten werden (s.Tabellenanhang Tab.16).

Eine Interaktion von Nickel und Cadmium im Darm ließ sich auf Grund der hohen Streuungen und sehr schlechten Korrelation nicht mit ausreichender Sicherheit als erwiesen ansehen (s. Tabellenanhang Tab.16).

Bei den essentiellen Metalle wurde der Kupfergehalt der Niere und des Darms von steigenden Nickelkonzentrationen in der Diät beeinflußt.

In der Niere wurde der durch die Basisdiät erhöhte Kupfergehalt um bis zu 25% reduziert (Ni-IV Gruppe). Dagegen erhöhte sich die Kupferkonzentration im Darm um bis zu 75% und die Erhöhung korrelierte streng mit dem Nickelgehalt der Diät (Abb.8)

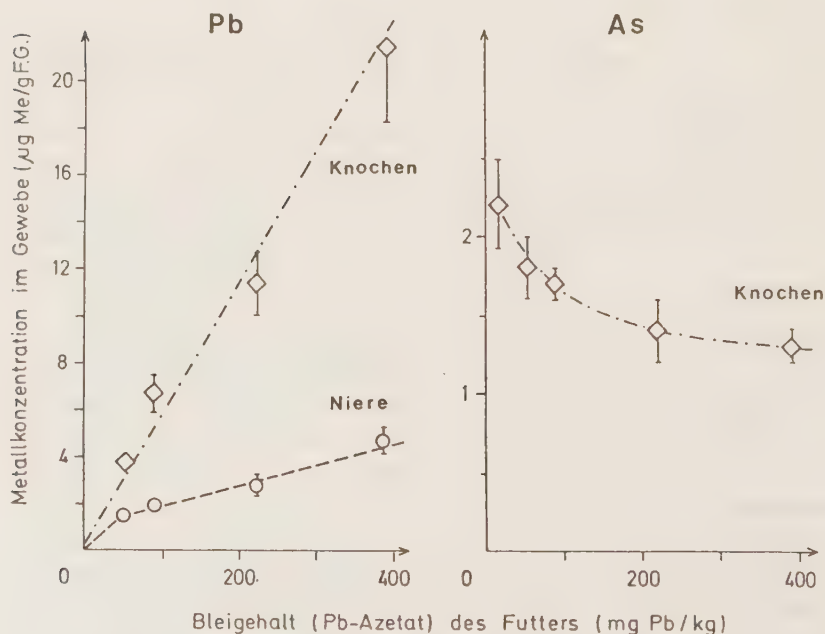


**Abb.8 :** Veränderung der Nickel- und Kupferkonzentrationen in Organen von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Nickelgehalt  
 Werte in  $\mu\text{g/g F.G.}$ ;  $\bar{M} \pm \text{SEM}$  ( $n=5$ );  $p < 0,05$ ;  $r = 0,956-0,878$   
 Zahlenwerte siehe Tabellenanhang Tab.16

#### 4.1.5 Blei

Wie schon beim Nickel lagen auch die Bleikonzentrationen in den Organen, Geweben und im Blut der Basisgruppentiere unter der Nachweisgrenze der ICP-AES ( $1,70 \mu\text{g/g F.G.}$ ). Die Auswahl dieses Bleigehalts der Basisdiät von  $20,7 \text{ mg/kg}$  Diät erfolgte auch wieder hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Metallkonzentrationen (s.4.1.4.).

Mit der AAS konnte Blei in Niere, Knochen, Darm und Haaren der Basisgruppentiere gut erfaßt werden, wobei die Niere und der Knochen den größten Bleizuwachs mit steigendem Bleigehalt in der Diät erfuhren. Der Anstieg in Niere und Knochen war linear. Mit Ausnahme des Darms war Blei ab der Pb-I Diät auch mit der ICP-AES meßbar. Bemerkenswert erscheint, daß in den Haaren eine weitere Steigerung der Bleikonzentration nach Fütterung der Pb-I Diät bis zur Pb-IV Diät nicht erfolgte. Interaktionen mit essentiellen Metallen ließen sich, unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen, nicht feststellen. Eine Reduktion der Arsenwerte im Knochen um bis zu 50% mit steigendem Bleigehalt in der Diät stellte die einzige nachgewiesene Interaktion mit toxischen Metallen dar.



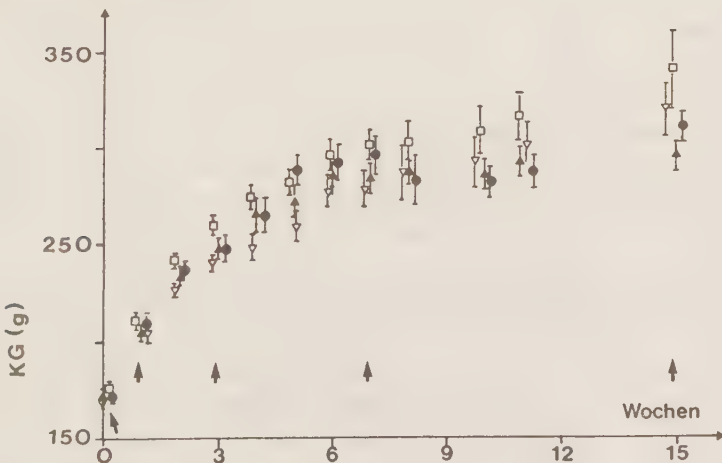
**Abb. 9 :** Veränderung der Blei- und Arsenkonzentrationen in Organen und Geweben von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Bleigehalt  
Werte in  $\mu\text{g/g F.G.}$ ;  $M \pm \text{SEM}$  ( $n=5$ );  $p < 0,05$ ;  $r = 0,992-0,878$   
Zahlenwerte siehe Tabellenanhang Tab.17+18

## 4.2 Zeitstudie

### 4.2.1 Wachstumsverlauf

Angeichts einer maximalen Versuchsdauer von 15 Wochen haben wir schon durch Auswahl der Diäten, die verfüttert werden sollten, versucht eine ernste chronische Intoxikation der Tiere weitestgehend auszuschließen. Die Konzentration von 30 mg As/kg Diät in der As-II Diät erschien uns als Höchstdosis ausreichend.

Wie aus Abb.10 zu ersehen ist, lagen die Körpergewichte der einzelnen Gruppen zu jedem Zeitpunkt nahe beisammen, so daß sich ein signifikanter Unterschied nicht erkennen ließ. Doch schienen die Tiere der As-II Gruppe zwischen der 2. und der 7. Woche im Mittel weniger stark zuzunehmen als die der übrigen Gruppen. Umgekehrt gediehen die Tiere der Basisgruppe am besten. Doch auf Grund der Streuungen innerhalb jeder Gruppe waren diese Beobachtungen statistisch nicht signifikant und können allenfalls Tendenzen darstellen.



**Abb.10** : Wachstumsverlauf von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt

▲ Kontrollen (0,044 mg As/kg Diät), □ Basisgruppe (7,5 mg As/kg Diät)  
● As-I Gruppe (15 mg As/kg Diät), ▽ As-II Gruppe (30 mg As/kg Diät)  
M ± SEM (n=16, 0.-1. Woche), (n=12, 2.-3. Woche),  
(n=8, 4.-7. Woche), (n=4, 8.-15. Woche)

↑ Tötungszeitpunkte, Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab.32

#### 4.2.2 Metallkonzentrationen in der Niere

Auf Grund der in der Pilotstudie festgestellten As-Cu-Interaktion in der Niere, verdienen insbesondere die Arsen- und Kupferwerte und darüber hinaus die Cadmiumkonzentrationen Aufmerksamkeit. Andere Metalle, wie Eisen, Mangan, Zink, Nickel und Blei wurden zwar mit der ICP-AES quantitativ bestimmt, erwiesen sich aber im Zeitversuch bedeutungslos. Entweder lagen ihre Werte während der ganzen Zeit unter der Nachweisgrenze oder, sofern sie sich darüber befanden, waren sie keinen Veränderungen unterworfen, die in irgendeinen Zusammenhang mit der As-Cu Interaktion gebracht werden konnten.

Die Arsenanalysen von Nierenrinde und -mark ergaben ein ähnliches Bild. In Abhängigkeit von der Arsenkonzentration der Diät wurde ein Anstieg des Arsengehalts beobachtet. Ein maximaler Wert von ca. 6 µg/g F.G. im Nierenmark und etwa 8,5 µg in der Nierenrinde wurde bei den Tieren der As-II Gruppe schon nach der 3. Woche erreicht, während sich die Arsenwerte der As-I Gruppen erst ab der 7. Woche diesem Wert näherten. Die Arsenkonzentrationen im Nierenmark der Basisgruppen stiegen innerhalb der 15 Wochen stetig an, in der Rinde stagnierten sie bis zur 7. Woche (Abb.11 + 12). Im Vergleich zur Pilotstudie waren alle Gewebearsenwerte erniedrigt, unabhängig in welchem Organ.

Die As-Cu-Interaktion in Niere zeigte sich in Abhängigkeit der Zeit und der Arsenkonzentration in der Diät nur in der Nierenrinde (Abb.13). Schon nach der 1. Woche wurde ein Kupferanstieg in der Nierenrinde der As-II Gruppe erkennbar, der sich in den zwei folgenden Wochen deutlich fortsetzte. Von da an trat eine Stagnation ein, während sich in den übrigen Gruppen, bis auf die Kontrollen, zwischen der 3. und 7. Woche der Kupfergehalt erhöhte und den der As-II Gruppe der 15. Woche erreichten, wenn nicht gar übertrafen. Im Nierenmark wurde Kupfer in den 15 Wochen des Zeitversuchs nicht akkumuliert, unabhängig welche Diät verfüttert wurde (Abb.14).

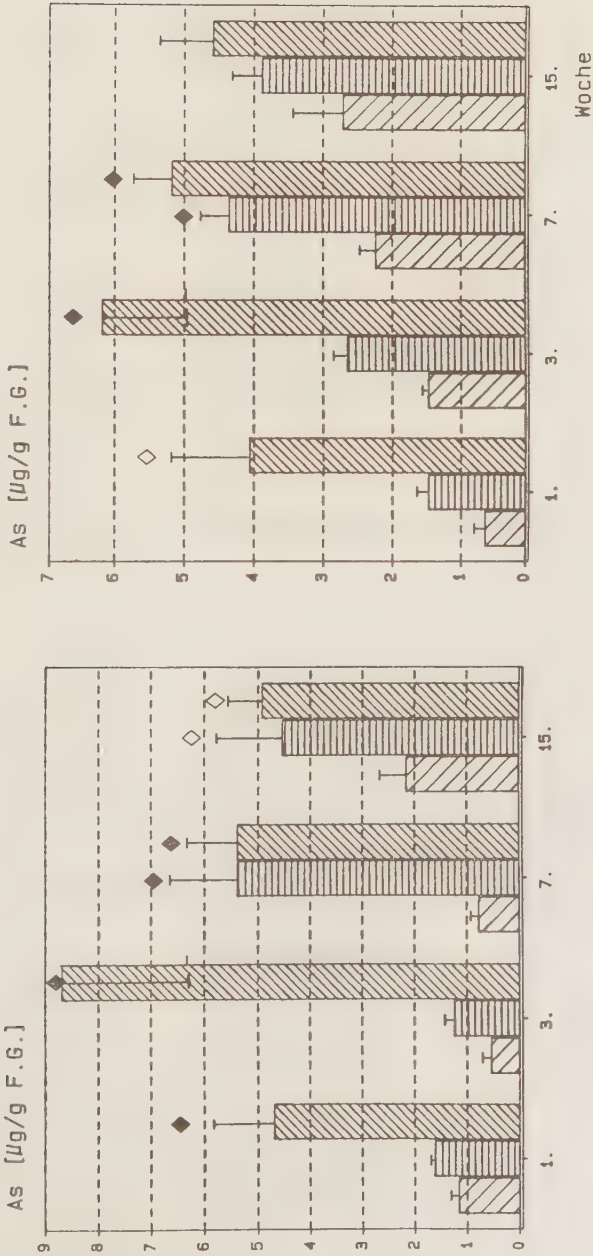


Abb.11 und Abb.12 : Zeitliche Veränderungen der Arsenkonzentrationen in der Mierentinde und im Miermark von Ratten bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt  
 Kontrollen (0,044 mg As/kg Diät), Basisgruppe (7,5 mg As/kg Diät)  
 As-I Gruppe (15 mg As/kg Diät), As-II Gruppe (30 mg As/kg Diät)  
 M  $\pm$  SEM (n=4), Werte in  $\mu\text{g/g}$  F.G.,  $p < 0,05$   $\blacklozenge$ ,  $p = 0,10$   $\diamond$   
 Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab.20,23,26,29

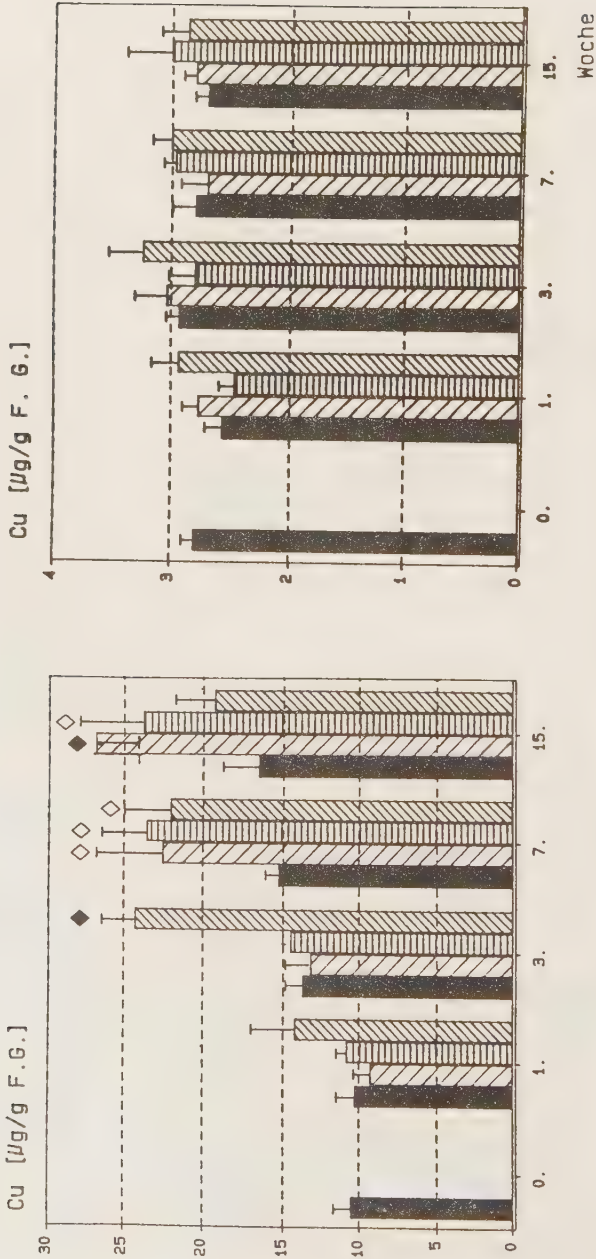
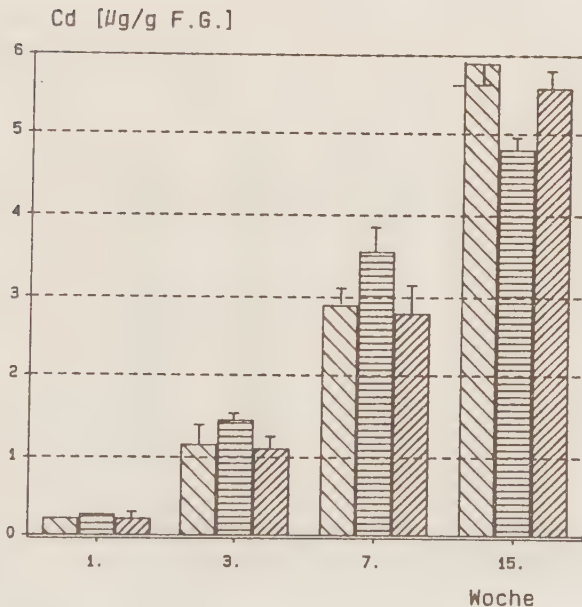


Abb.13 und Abb.14 : Zeitliche Veränderungen der Kupferkonzentrationen in der Milierinde und im Miliermark von Ratten bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt  
 Arsengehalt der Diäten s. Abb.11 und 12, Werte in µg/g F.G.  
 N ± SEM (n=4), p<0,05 ◆, p=0,10 ◇ Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab.19, 21, 24, 27, 30  
 ■ Kontrolle, ▨ Basisgr., ▧ As-I Gr., ▩ As-II Gr.

Die Entwicklung der Cadmiumkonzentration in der Niere in den verschiedenen Gruppen während des Zeitversuchs erschien uns von Bedeutung, da wir uns davon Hinweise zur Klärung der As-Cu-Interaktion versprochen. Doch Cadmium reicherte sich in der Nierenrinde ohne erkennbaren Bezug zum Kupfer oder zum Arsen kontinuierlich an (Abb.15). Unterschiede zwischen den Basisgruppen und den As-I oder den As-II Gruppen waren nicht vorhanden.



**Abb.15 :** Zeitliche Veränderung der Cadmiumkonzentration in der Nierenrinde von Ratten bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt

Arsengehalt der Diäten s. Abb.11 und 12, Cadmiumgehalt der Basis-, As-I- und der As-II Diät jeweils 11,2 mg Cd/kg Diät

M  $\pm$  SEM (n=4), Werte in  $\mu\text{g/g}$  F.G.

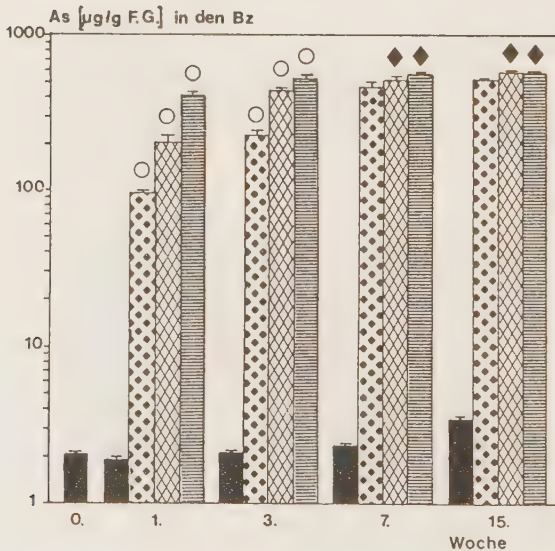
 Basisgr.,  As-I Gr.,  As-II Gr.

Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab. 22,25,28,31

#### 4.2.3 Arsengehalt der Blutzellen

- Auswirkung des Restblutgehalts der Nierenrinde auf die Arsenkonzentration in der Nierenrinde

Bei der Betrachtung der Abbildung 16 fällt die parallele Entwicklung der Arsenkonzentrationen in den Blutzellen verglichen mit denen in Nierenmark und -rinde auf. Die Arsenakkumulation in den Blutzellen war bei den As-II Gruppen nach der 1.-2. Woche, bei den As-I Gruppen nach der 3.-4. Woche und bei den Basisgruppen nach der 7. Woche mit dem Erreichen eines maximalen Wertes von ca. 600  $\mu\text{g/g}$  abgeschlossen.



**Abb.16 : Zeitliche Veränderung der Arsenkonzentration in den Blutzellen von Ratten bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt**

Arsengehalt der Diäten s. Abb.11 und 12, Werte in  $\mu\text{g/g F.G.}$

Ordinate logarithmisch,  $M \pm \text{SEM}$  ( $n=4$ ),  $p < 0,05$  ♦,  $p = 0,01$  ○

Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab. 19, 20, 23, 26, 29

■ Kontrolle, ◻ Basisgr., ▨ As-I Gr., ▤ As-II Gr.

Ein durchschnittlicher Restblutgehalt von 7,6 mg Blut  $\pm$  2,5 (SD) pro g Nierenrinde wurde aus 15 Stichproben ermittelt.

Wird für jede Gruppe zu allen Zeitpunkten der durchschnittliche Arsengehalt pro Gramm Blutzellen, bei Annahme eines Haematokritwertes von 50 %, umgerechnet auf ein Gramm Blut, so bedingte der Restblutgehalt in der Nierenrinde einen Arsengehalt wie Tabelle 9 zeigt.

**Tab.9 : Arsengehalt in der Nierenrinde bedingt durch den Restblutgehalt und dessen prozentualer Anteil an den Arsenkonzentrationen in der Nierenrinde**

1. M  $\pm$  SD (n=15); Werte in  $\mu\text{g/g}$  F.G.

2. Prozentualer Anteil berechnet mit dem Mittelwert von 1. Arsenkonzentrationen in der Nierenrinde s. Tab. 20,23,26,29

| Zeit(Wochen) | Basisgruppe     | As-I Gruppe     | As-II Gruppe    |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1.           | 0,36 $\pm$ 0,12 | 0,78 $\pm$ 0,26 | 1,56 $\pm$ 0,52 |
| 3.           | 0,89 $\pm$ 0,30 | 1,69 $\pm$ 0,56 | 2,04 $\pm$ 0,68 |
| 7.           | 1,74 $\pm$ 0,58 | 1,94 $\pm$ 0,65 | 2,14 $\pm$ 0,71 |
| 15.          | 2,00 $\pm$ 0,66 | 2,22 $\pm$ 0,79 | 2,17 $\pm$ 0,72 |
| 1.           | = 30,7 %        | = 48,0 %        | = 33,0 %        |
| 3.           | = 60,5 %        | = 63,8 %        | = 23,4 %        |
| 7.           | = 77,7 %        | = 36,0 %        | = 39,6 %        |
| 15.          | = 90,1 %        | = 48,9 %        | = 44,3 %        |

Der Kupfergehalt in der Nierenrinde wurde durch den Restblutgehalt nicht beeinflusst, da in den Blutzellen mit etwa 0,8  $\mu\text{g/g}$  Blutzellen je nach Zeitpunkt zwischen 100 - 500mal weniger Kupfer als Arsen vorhanden war.

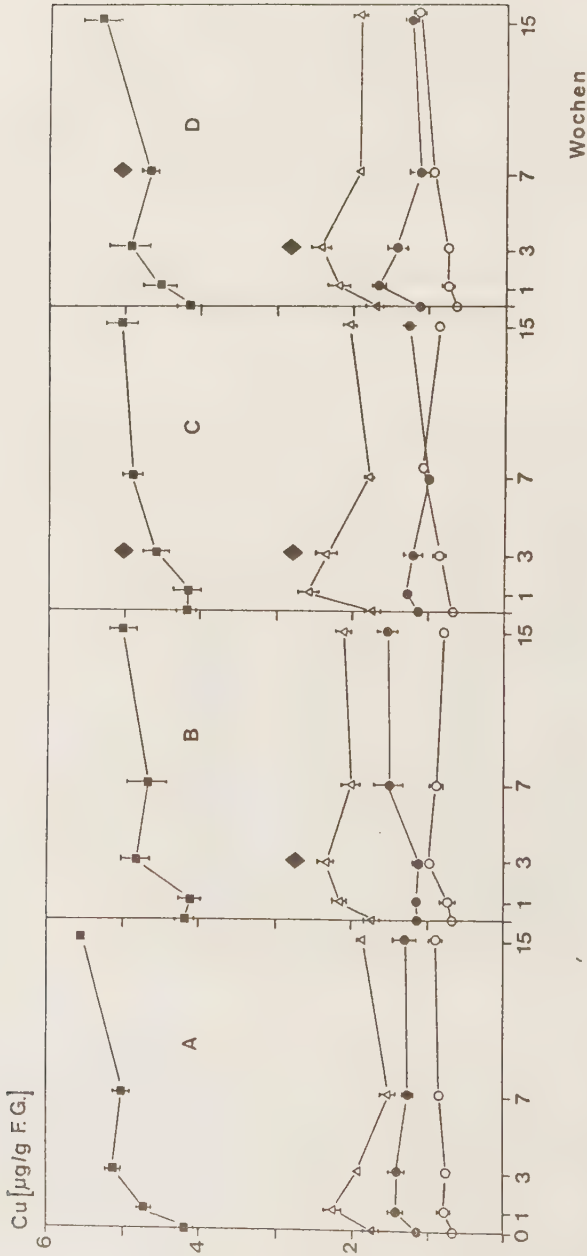


Abb.17 : Zeitliche Veränderung der Kupferkonzentrationen in der Leber, in der Mukosa, im Plasma und in den Blutzellen von Ratten bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt

■ Leber, △ Mukosa, ● Plasma, ○ Blutzellen

A Kontrolle, B Basisgr., C As-I Gr., D As-II Gr.

M ± SEM (n=4); ♦ p<0,05

Werte in µg/g F.G., Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab. 19,21,24,27,30

#### 4.2.4 Kupfergehalt in Leber, Mukosa und Blut

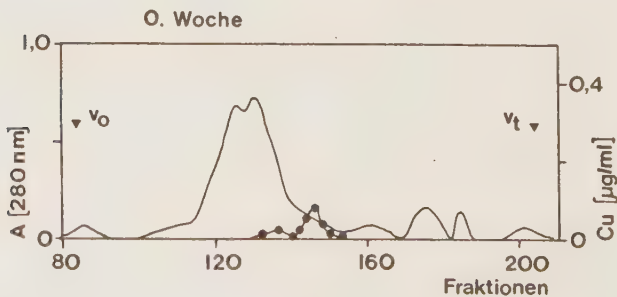
Die Konzentrationen von Arsen und Cadmium in der Leber, in der Mukosa und im Blut wurden zwar ermittelt (siehe Tabellenanhang), sollen hier jedoch nicht weiter erläutert werden, da sie sich zur Klärung der As-Cu-Inter-aktion in der Niere als nutzlos herausstellten.

Sofern Änderungen im Kupfergehalt in der Leber, in der Mukosa, im Plasma und in den Blutzellen auftraten, waren sie sehr gering und statistisch oft nicht signifikant (Abb.17) Der Anstieg der Kupferwerte, der in den Lebern der Kontrollen mit der Zeit zu beobachten war, verläuft bei allen übrigen Gruppen flacher. Umgekehrt blieb ein erhöhter Kupfergehalt in der Mukosa bei den Basis-, As-I und As-II Gruppen bis etwa zur 7. Woche erhalten, während bei den Kontrollen ein Abfall bis zur 7. Woche und dann wieder ein Ansteigen festzustellen war. In den Blutzellen verlief die Entwicklung der Kupferkonzentrationen entgegen der in der Nierenrinde. Zeitversetzt erreichten Basis-, As-I und As-II Gruppen einen erhöhten Kupferwert. Diese Beobachtung war aber nicht signifikant. Im Plasma traten keine Veränderungen auf.

#### 4.2.5 Gelchromatographie von Homogenatüberständen der Nierenrinde und Metallgehalt der Fraktionen

Ultrazentrifugierte Homogenatüberstände enthalten keine Zellorganellen, sondern die löslichen Proteine und anderen Bestandteile des Cytosols. Die Gelchromatographie solcher komplex zusammengesetzter Proben erbringt nicht in allen Molekulargewichtsbereichen definierte Peaks. Erhaltene Proteinprofile, in denen hoch-, mittel- und niedermolekulare Proteine unterschieden werden können, dienen in der Toxikologie wie in unserem Beispiel zur Beurteilung der Metallverteilung in den verschiedenen Molekulargewichtsbereichen. Bei der Analyse der Homogenatüberstände mittels der Gelchromatographie und anschließender Metallbestimmung in den Fraktionen beschränkten wir uns bei der Aufarbeitung auf je zwei Proben der Kontroll-, Basis- und As-II Gruppe zu den Zeitpunkten 3. und 15. Woche und zusätzlich zwei Proben der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0. Woche. Unterschiede im Proteinprofil zwischen den Kontroll-,

den Basisgruppen oder den As-II Gruppen zu den untersuchten Zeitpunkten 3. und 15. Woche ergaben sich nicht. Unabhängig davon welcher Zeitpunkt betrachtet wurde, fand sich Kupfer hauptsächlich in den Fraktionen Nr. 141-148 und Nr. 130-136, was Molekulargewichten von ca. 13 kD und 30 kD entspricht. Cadmium cochromatographierte mit Kupfer in der Fraktion Nr. 141-148; Arsen erschien an zwei Stellen etwa bei einem Molekulargewicht von 30 kD und 2 kD. Der Kupfergehalt in der Fraktion Nr. 141- 148 zeigte in Abhängigkeit der Zeit und der Arsenkonzentration in der Diät eine Parallele zum Kupfergehalt in der Nierenrinde. Auch hier wurden die höchsten Kupferwerte nach der 3. Woche bei den Tieren der As-II Gruppe gemessen, während sie bei den Tieren der Basisgruppe erst nach der 15. Woche erreicht wurden. Cadmium akkumulierte in derselben Fraktion kontinuierlich bei allen Gruppen, mit Ausnahme der Kontrollen, wie das schon in der Nierenrinde festgestellt werden konnte. Bei allen Gruppen erhöhte sich nach der 15. Woche der Proteingehalt in der Fraktionen Nr. 141- 148, so daß sich der Peak deutlicher vom Untergrund abhob. Dieser Proteinpeak blieb auch bei der Gelfiltration von hitzedenaturierten Homogenatüberständen erhalten; der Metallgehalt in dieser Proteinfraction ebenfalls. Die höhermolekularen Proteine wurden dagegen durch den Hitzeschritt denaturiert und erschienen im Elutionsprofil nicht mehr.



**Abb.18** : Gelfiltration von Nierenrindenhomogenaten zu Beginn der Zeitstudie (0. Woche) und Metallgehalt der Fraktionen  
Bedingungen s. Abb.19 nächste Seite

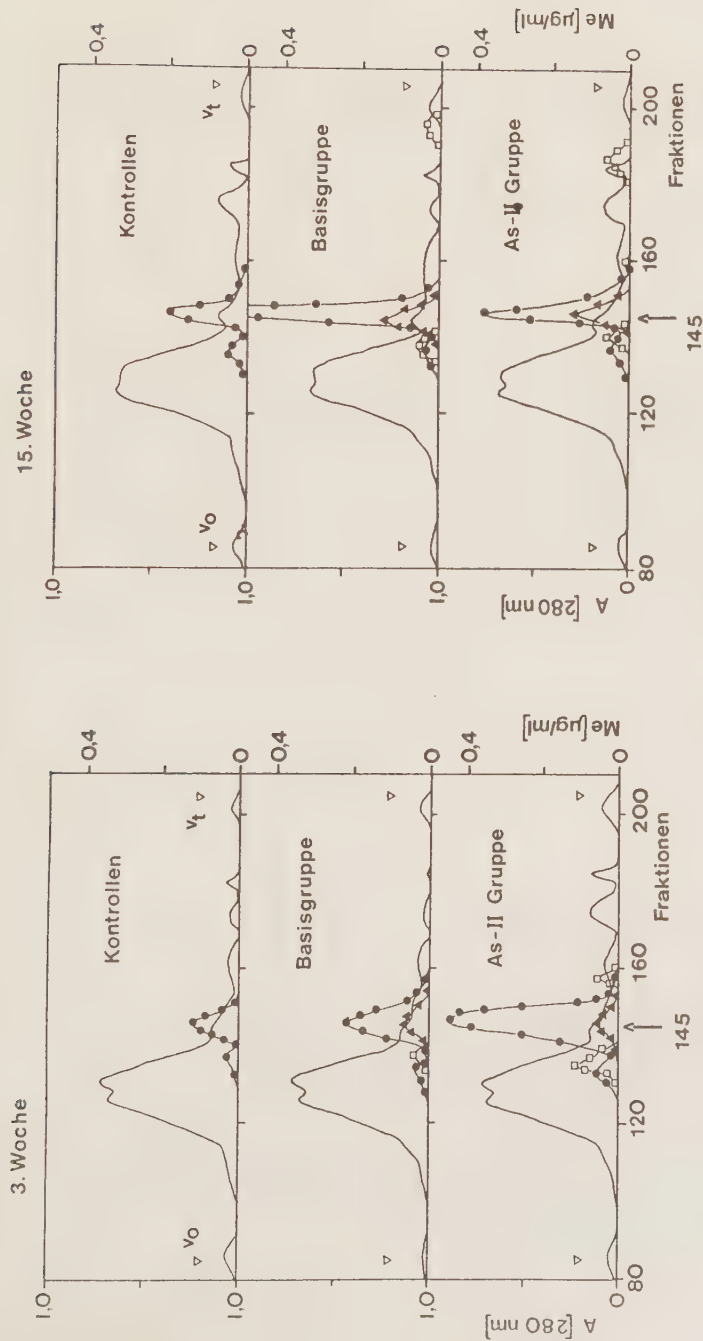


Abb. 19 und 20 : Gelfiltration von Miererindenhomogenaten nach der 3. und 15. Woche der Zeitstudie und Metallgehalt der Fraktionen

Säule : 2,0 x 100 cm  
 Stationäre Phase : Fraktogel TSK 55 (S)  
 Mobile Phase : Tris-HCl 0,05 M + KCl 0,1 M/1; pH 7,5  
 Fraktionen : 1,5 ml  
 Durchfluß : 8 ml/h  
 Detektion : 280 nm  
 Probenvolumen : 1 ml  
 N (n=2)

— Protein, —●— Kupfer, —□— Arsen, —▲— Cadmium, Metallgehalte µg/ml Fraktion

#### 4.2.6 Untersuchung hitzedenaturierter Homogenatüberstände an der HPLC sowie Rechromatographie von Fraktionen der Gelfiltration

Anhaltspunkte für die Identität des kupfer- und cadmiumbindenden Proteins waren folgende vorhanden :

- ein metallbindendes Protein, das bei einem MG von 13 KD erscheint
- größtenteils hitzestabil

Auf Grund der begrenzten Probenmengen konnten weitere Gelfiltrationsläufe nicht durchgeführt werden, und deshalb erfolgte die Cochromatographie von Rattenleber-Metallothionein und hitzedenaturierten Überständen mit der HPLC (Abb.21). In hitzedenaturierten Homogenatüberständen aller Gruppen der 3. Woche deutete sich ein Proteinpeak nur an und hob sich bei allen Gruppen nach der 15. Woche vom Untergrund deutlicher ab.

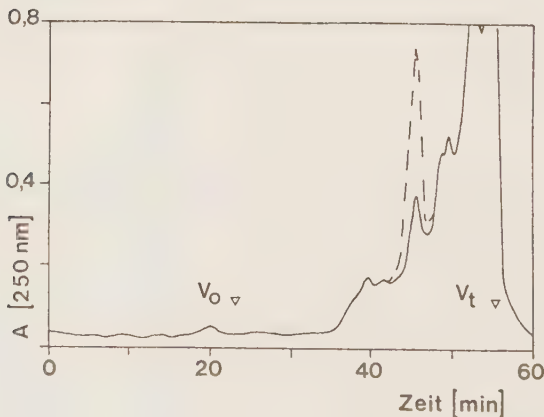
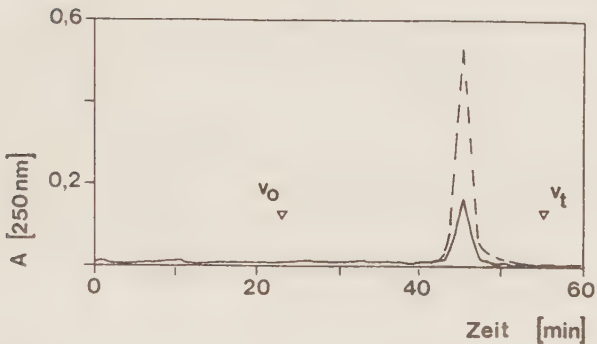


Abb.21 : HPLC- Analyse von hitzedenaturierten Homogenatüberständen nach der 15. Woche der Zeitstudie

----- Probe: hitzedenaturierte Homogenatüberstände  
- - - - - Cochromatographie von Rattenleber-MT  
Bedingungen s. Abb.22

Rechromatographie der Fraktion Nr. 145 der Gelfiltration ergab einen Peak, der ebenfalls mit Rattenleber-MT cochromatographierte.



**Abb.22** : Rechromatographie der Fraktion Nr. 145 der Gelfiltration an der MPLC

— Probe : Fraktion Nr. 145  
- - - Cochromatographie von Rattenleber-MT

|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| Sküle            | : 7,5 x 600 mm             |
| Stationäre Phase | : Ultro Pac TSK G 3000 SW  |
| Mobile Phase     | : Tris-HCl 0,1 M/l; pH 6,5 |
| Durchfluß        | : 0,48 ml/ min             |
| Druck            | : 48 bar                   |
| Detektion        | : 250 nm                   |
| Probenvolumen    | : 50 µl                    |

#### 4.2.7 Disk-Elektrophorese von hitzedenaturierten Homogenatüberständen

Nachdem wir festgestellt hatten, daß das kupfer- und cadmiumbindende Protein mit MT cochromatographierte, diente die Disk-Elektrophorese der weiteren Identifizierung. Es gibt verschiedene Isoformen von MT, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden und elektrophoretisch trennbar sind.

In allen untersuchten Proben, sowohl von Kontrollen als auch von behandelten Tieren, war immer MT 2 vorhanden, jedoch niemals MT 1.

### 4.3 Urinuntersuchungen

Weitere Hinweise zur Klärung der As-Cu-Interaktion in der Niere erhofften wir uns zum einen von Arsen- und Kupferbestimmungen im Urin, und zum anderen von Enzymaktivitätsbestimmungen und von SDS-Elektrophoresen der im Urin enthaltenen Proteine. Da die As-Cu-Interaktion in der Niere schon nach der 2. Woche auch bei der Basisgruppe mit einem Arsengehalt von 7,5 mg As/kg Diät deutlich sichtbar wurde (Pilotstudie), war zu erwarten, daß eine eventuell auftretende Beeinflussung der Kupferausscheidung schon vorher zu erkennen sein müßte. Im Gegensatz zur Zeitstudie wurde zusätzlich zur Basisdiät die As-III Diät mit einem Arsengehalt von 60 mg/kg verfüttert, um eine vielleicht geringe Veränderung der Kupferausscheidung durch Gabe einer hohen Arsendosis gerade noch sichtbar zu machen.

#### 4.3.1 Arsen- und Kupferausscheidung

Arsen erschien schon nach dem 1.Tag der Studie im Urin, wobei eine Korrelation zwischen dem Arsengehalt der Diät und der Arsenausscheidung bestand. Bei den Tieren der As-III Gruppe, die einen achtmal höheren Arsengehalt im Futter hatten als die Tiere der Basisgruppe, war die Arsenausscheidung nach dem 1.Tag der Fütterung zehnmal höher (Abb.23). Während bei der As-III Gruppe bis zum 4.Tag ein stetiger, aber nicht signifikanter, Anstieg der Arsenausscheidung und zwischen dem 4.und 8.Tag ein deutlicher Sprung von 14 µg As/ml Urin auf 56 µg/ml Urin zu beobachten war, konnte bei der Basisgruppe schon nach dem 1.Tag ein Wert von ca. 1 µg/ml festgestellt werden, der im Verlauf der Untersuchung nicht überschritten wurde.

Die Kupferausscheidung der Basisgruppe und der As-III Gruppe ging nach dem 1.Tag um 50%-70% zurück und zwar unabhängig vom Arsengehalt der verfütterten Diäten. Ab dem 4.Tag erreichte die Kupferausscheidung der Basisgruppe wieder etwa die Werte wie zu Beginn der Untersuchung (0. Tag), doch bei den Tieren der As-III Gruppe blieb die Verminderung

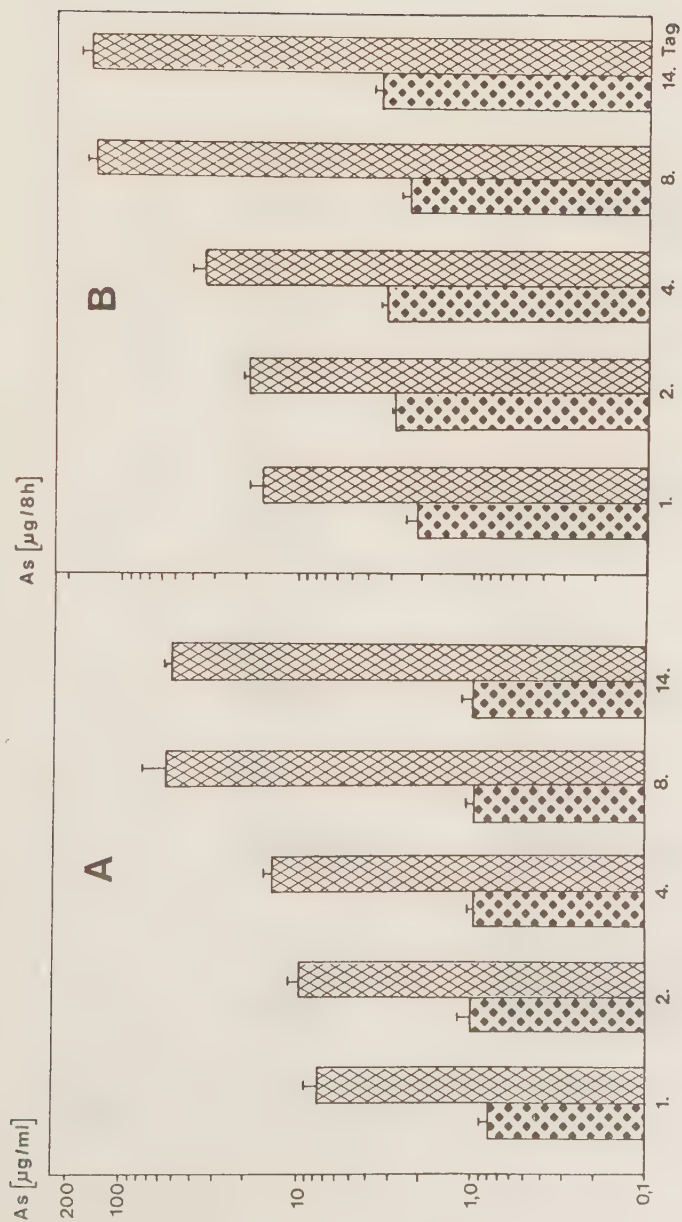


Abb.23 : Arsenkonzentrationen im Urin von Ratten bei Fütterung arsenhaltiger Diäten



Basissgruppe : 7,5 mg As/kg Diät

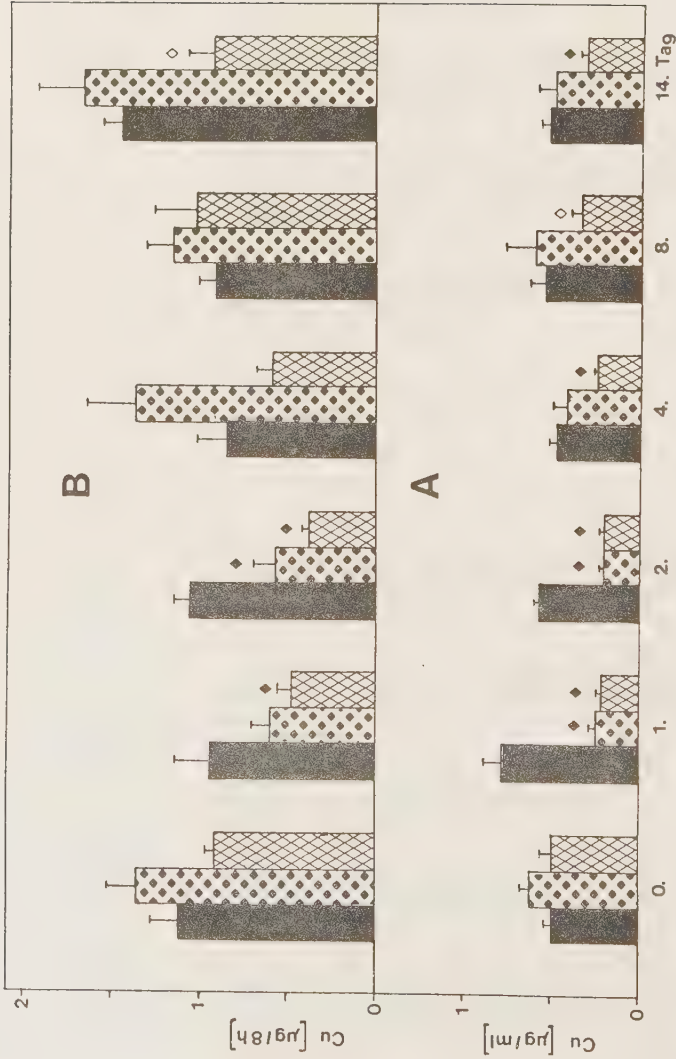
As-III Gruppe : 60 mg As/kg Diät

Werte in **A**  $\mu\text{g/ml}$  Urin und **B**  $\mu\text{g/8 h}$  Urinvolumen

$\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5),  $p < 0,01$

Ordinate logarithmisch

Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab.34,36



**Abb. 24** : Kupferkonzentrationen im Urin von Ratten bei Fütterung arsenhaltiger Diäten  
 $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5):  $p < 0,05$  ◆,  $p = 0,10$  ◇, Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab. 34,36

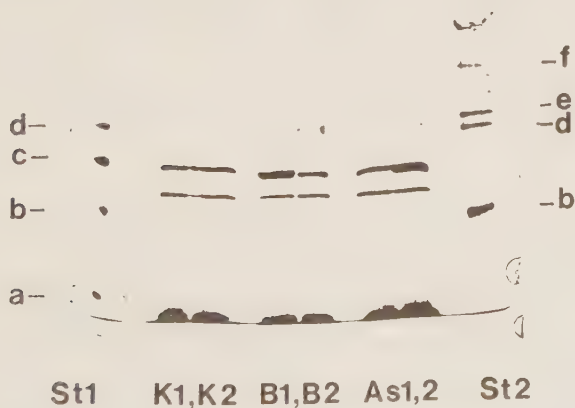
Kontrolle : 0,044 mg As/kg Diät  
 Basisgruppe : 7,5 mg As/kg Diät  
 As-III Gruppe : 60 mg As/kg Diät

Werte in **A** µg/ml Urin und **B** µg/8 h Urinvolumen  
 Zahlenwerte s. Tabellenanhang Tab. 34,36

der Kupferausscheidung bis zum 14.Tag erhalten, doch auf das 8 h Urinvolumen bezogen ergab sich bis auf den 14.Tag kein Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb.24).

#### 4.2.2 Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen von Rattenurin

Die Prüfung der Proteinausscheidung durch SDS-Elektrophorese erbrachte zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen den Kontrollen und den Tieren der Basis- und der As-III Gruppe. Höhermolekulare Proteine wurden nicht in nennenswertem Umfang ausgeschieden. Die Abbildung 25 zeigt ein repräsentatives SDS-Gel von Urinproben des 8. Tages.



**Abb.25 : SDS-Gel von Urinproben des 8. Tages bei Fütterung arsenhaltiger Diäten**

K 1 + K 2 Kontrollen, B 1 + B 2 Tiere Basisgruppe

As 1 + As 2 Tiere As-III Gruppe

St 1 + St 2 Standards (Firma Bio Rad)

a Lysosym 14.400 D

b Ovalbumin 45.000 D

c BSA 66.200 D

d Phosphorylase B 92.500 D

e Galaktosidase 116.250 D

f Myosin 200.000 D

SDS-PAGE : Trenngel 10%, Sammelgel 3%

#### 4.3.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Urin

Die Alkalische Phosphatase findet sich in der Niere hauptsächlich im proximalen Tubulus (38). Der Nachweis einer erhöhten Aktivität der AP im Urin dient als Hinweis einer Schädigung dieses Bereichs.

Die Tiere der Kontrollgruppe und der Basis- und As-III Gruppe unterschieden sich in der Aktivität der AP im Urin nicht.

#### 4.4 Rechnerische Kupferbilanzierung

Die Tabelle 10 zeigt den Versuch einer rechnerischen Bilanz. Unter Berücksichtigung eines durchschnittlichen Nierengewichts von 1 g ergaben sich bei zwei Nieren vermehrte Kupfermengen in der Basisgruppe und in den Gruppen As-I - IV in der Pilotstudie im Vergleich zu Kontrollen. Die Zeilen 2-4 verdeutlichen die verringerten Kupferwerte in den Lebern und im Blut, bei Annahme eines durchschnittlichen Lebergewichts von 12 g und eines Blutvolumens von 18 ml.

**Tab.10 : Rechnerische Kupferbilanz in Nieren, Leber, Blut und Urin von Ratten nach Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt im Vergleich zu Kontrollen**

Werte für vermehrtes Kupfer  $\mu\text{g}/2$  Nieren (+), Verminderung in der Leber  $\mu\text{g Cu}/\text{Gesamtleber}$  (-), Verminderung im Blut  $\mu\text{g Cu}/9$  ml PLasma bzw. 9 g Blutzellen (-), verringerte Kupferausscheidung  $\mu\text{g Cu}/14$  Tage (-)  
Ermittlung aller Werte mit Hilfe der Mittelwerte aus der Pilotstudie und den Urinuntersuchungen

| Probe       | Basisgr. | As-I   | As-II  | As-III    | As-IV  |
|-------------|----------|--------|--------|-----------|--------|
| Nieren I    | + 6,0    | + 10   | + 30   | + 80      | + 152  |
| Leber       | - 1,7    | - 2    | - 7,5  | - 15      | - 18   |
| Plasma      | - 1,0    | - 0,3  | - 0,5  | - 2       | - 4    |
| Blutzellen  | - 1,0    | - 2,0  | - 1,5  | - 3       | - 4    |
| Summe       | - 3,7    | - 4,3  | - 9,5  | - 20      | - 26   |
| Anteil an I | = 50 %   | = 43 % | = 32 % | = 25 %    | = 17 % |
| Urin        | - 3,5    |        |        | - 14-20   |        |
| Anteil an I | = 50 %   |        |        | = 16-25 % |        |

Der Berechnung der verringerten Kupferausscheidung in 14 Tagen wurden die Analysenwerte pro ml Urin und das Urinvolumen pro 8 h zu Grunde gelegt.

Obwohl sich mit zunehmendem Arsengehalt der Diät die Gesamtmenge an Kupfer in Leber, Plasma und Blutzellen zunehmend verringert, reichen diese Mengen nicht aus, um die hohen Kupferwerte in den Nieren zu erklären. Der prozentuale Anteil der Umverteilung an dem erhöhten Kupfergehalt der Nieren nimmt ab. Die verminderte Kupferausscheidung kann nur bei der Basisgruppe zu einer annähernd vollständigen Erklärung über die Herkunft der erhöhten Kupferkonzentrationen in den Nieren beitragen. Der mit steigendem Arsengehalt der Diäten größer werdende Prozentsatz an Kupfer, der zu einer ausgeglichenen Bilanz fehlt, könnte durch eine gesteigerte Resorption oder durch eine Umverteilung aus anderen Geweben, die nicht untersucht wurden, zu den Nieren gelangen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Pilotstudie

#### 5.1.1 Cadmium

##### 5.1.1.1 Organ- bzw. Gewebeverteilung

Aus der Literatur läßt sich vielfach ersehen, daß sich Cadmium hauptsächlich in Leber, Niere, Darm, Milz und Pankreas anreichert, wobei die Dosis, die Expositionszeit, der Applikationsweg und die chemische Form, in der das Cadmium verabreicht wird, ausschlaggebend für die Organverteilung ist. Niedrige Dosen, oral appliziert, bewirken die Akkumulation von Cadmium vornehmlich in der Leber (39), die auch in Kurzzeitversuchen, auch bei nur einmaliger Verabreichung, das Hauptzielorgan ist (40). In Langzeitversuchen (400 - 745 Tage) finden sich in der Niere die höchsten Cadmiumkonzentrationen (41,42). Nach parenteraler Applikation enthält die Leber nach 72 Stunden mehr Cadmium als die Niere (43,44). Wird Cadmium nicht als anorganisches Salz, sondern als Cadmium-Metallothionein (Cd-MT) p.o. verabreicht, so findet sich der Hauptanteil des Cadmiums in der Niere (40). Von Nordberg und Engström (45) wurde 1979 vermutet, daß durch das Cadmium zuerst in der Leber eine MT-Synthese induziert wird. Das Cd-MT könnte im Blut zur Niere transportiert werden und führt dort zu einer Cadmiumakkumulation (45).

Metallothionein (MT) ist ein hitzestabiles, cysteinreiches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 6.000 D, ohne aromatische Aminosäuren, dessen Synthese durch Cd, aber auch durch andere Metalle wie z.B. Kupfer, Zink oder Quecksilber induzierbar ist (46,33,47,48). In Abhängigkeit vom Kupfer- und Zinkgehalt der verfütterten Diät erscheinen diese Metalle in den Organen und Geweben (49) und induzieren eine Grundgehalt an MT. Die induzierenden Metalle, aber auch andere, können an MT gebunden werden. Zieht man die Befunde aus der Literatur zur Diskussion unserer Ergebnisse zu Rate, so sollte die Leber bei der Verfütterung der Diäten im Vergleich zur Niere und zum Darm Hauptzielorgan sein. In unseren Untersuchungen stellte im Gegensatz dazu immer

der Darm das Hauptzielorgan dar, dann erst gefolgt von der Niere und der Leber. Erst bei sehr hohem Cadmiumgehalt der Diät (Cd-IV) wurden in Leber und Niere Cadmiumkonzentrationen erreicht, die diejenigen im Darm übertrafen. Dies zeigt, daß der Darm in der Vergangenheit in seiner Bedeutung für die Cadmiumbelastung unterschätzt wurde.

#### 5.1.1.2 Beurteilung der Cadmiumbelastung

Da unterschiedliche experimentelle Bedingungen zu einer unterschiedlichen Organverteilung führen können und die Lebensumstände von zu untersuchenden Individuen nicht immer bekannt sind, ist es zur Beurteilung der Cadmiumbelastung unverzichtbar, Analysendaten mehrerer Organe auszuwerten, zumal dann, wenn es sich um Autopsiematerial handelt, das post mortem erhalten werden kann. Da als Biopsiematerial das Blut, am leichtesten zugänglich ist, kann es zur Abschätzung einer erhöhten Cadmiumbelastung herangezogen werden, da sich eine steigende Cadmiumaufnahme in einer steigenden Cadmiumkonzentration in den roten Blutzellen äußert, auch wenn mit dem Arsen ein Element in der Nahrung mitangeboten wird, das in unserem Fall, bei der Ratte, eine sehr hohe Affinität zu den Erythrozyten hatte. Außerdem sollte Berücksichtigung finden, daß die Cadmiumresorption, aber auch die anderer Metalle mit fortschreitendem Alter verringert ist (45).

#### 5.1.1.3 Interaktion von Cadmium und Eisen

Die Erniedrigung der Eisenkonzentration in Leber, Niere und auch im Darm durch oral verabreichtes Cadmium wurde in der Literatur schon wiederholt beschrieben (50-52). Dies und der Befund, daß im Eisenmangelzustand sowohl Cadmium, als auch andere Metalle vermehrt resorbiert werden (53-55,4) weisen auf einen wenigstens teilweise gemeinsamen Resorptionsmechanismus hin. Unsere Studien zeigten, daß auch in Geweben, in denen Cadmium nicht nachgewiesen wurde, die Eisenwerte verringert waren, wie in der Haut und im Knochen. Im Gegensatz dazu blieben die Eisenwerte im Plasma und in den Blutzellen unverändert. Das legt die Vermutung nahe,

daß die Eisendepots im gesamten Organismus rapide und drastisch entleert wurden, bevor sich eine Eisenanämie im Blut manifestiert. Wie lange es dauert bis sich ein Eisenmangel im Blut abzeichnet, kann durch unsere Ergebnisse nicht aufgezeigt werden. Deshalb kann eine Eisenbestimmung im Blut im Frühstadium einer Cadmiumexposition allein nicht ausreichend sein, um den Verdacht auf eine durch Cadmium bedingte Eisenanämie zu entkräften.

#### 5.1.1.4 Einfluß von Cadmium auf Kupfer und Zink

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen des Cadmiums mit Kupfer in der Niere und mit Zink in der Leber (51,56,57) war bei unseren Untersuchungen nur ein minimaler Effekt sehr hoher Cadmiumdosen auf den Zinkgehalt der Leber feststellbar. Die Kupferkonzentrationen in allen untersuchten Proben waren auch bei hohem Cadmiumgehalt der Diät unverändert.

Da Stonard et al., 1976 (51) 100 mg Cd/kg Diät 40 - 50 Wochen verfüttert haben, um einen Kupferanstieg in der Niere und einen Zinkanstieg in der Leber zu erkennen, ist anzunehmen, daß die zweiwöchige Verfütterung von bis zu 180 mg Cd/kg Diät nicht ausreichend war. Erst eine relativ hohe Cadmiumbelastung über einen längeren Zeitraum führt zu einer Veränderung der Kupfer- und Zinkwerte, während der Eisenhaushalt wesentlich empfindlicher auch auf eine niedrigere Cadmiumbelastung reagiert. Dieser Unterschied wird darauf zurückgeführt, daß Cadmium schon die Resorption von Eisen nachhaltig beeinflusst, aber der Veränderung der Zink- und Kupferkonzentrationen in der Regel eine Induktion von MT vorausgeht.

#### 5.1.1.5 Interaktion von Cadmium und Mangan

Die Reduktion der Mangankonzentration im Duodenum bei hohem Cadmiumgehalt der Diät, bei unveränderten Mangangehalten in anderen Organen und Geweben, konnte durch eine Literaturrecherche nicht belegt werden. Allerdings wurde 1986 (58) von einer Reduktion der Cadmiumkonzentrationen in Blut, Leber und Niere bei Zusatz von 56 mg Mn/l Trinkwasser

nach acht Wochen berichtet. Die Manganwerte in diesen Proben waren unverändert geblieben. Im Gegensatz dazu fanden Goering et al., 1985 (59) eine Zunahme der Cadmiumkonzentration in Leber nach der Vorbehandlung mit Mangan s.c., 48 und 24 Stunden vor der Applikation von Cadmium i.v. Andere Gewebe enthielten bei dieser Vorbehandlung weniger Cadmium im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Tieren, bei denen auch eine wesentlich höhere Lethalität zu beobachten war. Die Autoren führen diesen Effekt auf eine schnelle zusätzliche MT-Synthese durch die subcutane Manganapplikation zurück, die in der Leber zwei Stunden nach der Applikation eine Akkumulation und Immobilisierung von Cadmium zur Folge hat und unmittelbar die Lethalität verringert. Ob schon bei der Resorption eine Beziehung zwischen Cadmium und Mangan besteht, wie es sich durch unsere Befunde andeutet, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur vermutet werden.

## 5.1.2 Arsen

### 5.1.2.1 Organ- bzw. Gewebeverteilung

Die Arsenverteilung im Organismus der Ratte bot folgendes Bild :  
ca. 85 % des im Körper vorhandenen Arsens fanden sich in den Erythrozyten und der Rest verteilte sich auf die Nieren, Leber, Darm, Haare (60,61). Durch den enorm hohen Arsengehalt der roten Blutkörperchen durfte der Restblutgehalt bei der Bestimmung des Arsenkonzentrationen der Organe nicht vernachlässigt werden, da er sie wesentlich beeinflussen konnte. Wie in Untersuchungen einer Semesterarbeit, durchgeführt am Walther-Straub-Institut 1985 (unveröffentlichte Ergebnisse) ergaben, verbleiben nach Entzug von 25 Prozent des errechneten Gesamtblutvolumens in der Niere noch 0,069-0,100 mg und in der Leber 0,049-0,107 mg Blut/g Gewebe. Das bedeutet z.B. bei einem Arsengehalt von 170 µg/g Blutzellen nach Verfütterung der Basisdiät einen Arsengehalt von ungefähr 2 - 5 µg/g in der Leber und von 3 - 4 µg/g in der Niere, was ca. 50-80 % bzw. 30-50 % der Gesamtarsenkonzentrationen in Leber bzw. Niere entspricht. Mit steigendem Arsengehalt der Diät erhöhten sich die Arsenwerte in den

Blutzellen, bis mit etwa 600  $\mu\text{g/g}$  eine Sättigung erreicht wurde. Von da an stiegen auch die Arsengehalte der Organe, die durch die Restblutkontamination verursacht wurden, nicht mehr weiter an (bis zu 20  $\mu\text{g/g}$  in Leber und Niere). Diese Überlegungen zeigen, daß die festgestellten Arsenkonzentrationen in den Lebern zu einem hohen Prozentsatz auf den Restblutgehalt zurückzuführen sind. Dadurch läßt sich auch die Gewebesättigung, die bei der Leber und beim Darm beobachtet wurde erklären. Der Arsengehalt der Niere wurde bis zur Verabreichung der As-II Diät auch stark vom Restblutgehalt bestimmt, doch ergab sich bei weiterer Steigerung der Arsenkonzentration in der Diät eine weitere Erhöhung der Arsengehalte der Niere, die aber keine Steigerung der Blutarsenkonzentration mehr zur Folge hatte. Der lineare Verlauf der Arsenkonzentration in der Niere in Abhängigkeit vom Arsengehalt der verfütterten Diät steht mit der beschriebenen Arsen-Kinetik in Einklang.

#### 5.1.2.2 Interaktion von Arsen und Kupfer

Die Interaktion von Arsen und Kupfer in der Niere der Ratte wurde schon von Mahaffey et al. (14) und Maehashi et al. (62) beschrieben. In beiden Fällen wurde eine erhöhte Kupferkonzentration in der Niere nach der Applikation von Arsen p.o. beobachtet. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurde die Wirkung nur einer einzigen Arsenkonzentration im Futter untersucht z.B. 50 ppm /kg Diät über 10 Wochen (14). Unsere Ergebnisse (4.1.2) zeigen, daß der Kupferanstieg in der Niere streng korreliert war mit dem Arsengehalt der Diät und mit dem Arsengehalt in der Niere selbst. Als Ursache dieser Kupferakkumulation in der Niere können theoretisch angenommen werden: (1) eine Umverteilung von Kupfer aus anderen Organen bzw. Geweben zur Niere, (2) eine gesteigerte Resorption und/oder nachfolgender Ausscheidung oder (3) nur eine verminderte Ausscheidung von Kupfer in der Niere und nachfolgender lokaler Anhäufung der Metalle.

Eine Umverteilung allein konnte die enormen Kupferwerte nicht verursacht haben, da die Verminderung der Kupferkonzentrationen in der Leber,

im Plasma und in den Blutzellen nach Verfütterung der As-III und As-IV Diäten nur etwa 25 % bzw. 17 % des Kupferanstiegs in der Niere ausmachten. Erhöhte Kupferwerte im Darm, als eventuelles Indiz einer gesteigerten Resorption konnte, zumindest im Duodenum, nicht festgestellt werden und eine Kontrolle der Metallausscheidung über den ganzen Tag war in unserem Versuchsansatz nicht sinnvoll durchführbar, da Faeces und Urin ständig mit Futterresten kontaminiert waren. Zur Klärung dieser Fragen waren weitere Untersuchungen nötig.

Interessant ist diese Interaktion nicht nur wegen der Parallelität, mit der die Arsen- und Kupferakkumulation in der Niere auftrat, sondern darüberhinaus auf Grund der Ausmaße, die sie annahm. Es wurde Kupferwerte gemessen, die das 20-fache der Normalwerte in der Niere überstiegen. Ob das konstante molare Verhältnis von Kupfer:Arten in der Niere von ca. 4:3 tatsächlich stöchiometrische Zusammenhänge widerspiegelt, kann ebenso nur vermutet werden, wie die eventuelle Beteiligung schwefelhaltiger Verbindungen. In der Literatur wird vom Auftreten eines As-bindenden Proteins in der Leber der Regenbogenforelle berichtet, das durch Arsen induziert wird (63). Doch sollte zum einen die Tierspezies, hier ein Fisch, und zum andern das Fehlen jeglicher Kupferanalysen in der Leber Grund zur Vorsicht vor übereilten Schlußfolgerungen geben. Der Vergleich mit Cadmium, das Metallothionein (MT) induziert, was wiederum die vermehrte Bindung von Cadmium selbst aber auch die anderer Metalle bewirkt, wäre eine zu starke Vereinfachung.

Es muß in Betracht gezogen werden, daß das Arsen, als Arsenit verabreicht, im Organismus nicht als zweiwertiges, komplexiertes Kation vorliegt wie das Cadmium, sondern als dreiwertiges Anion Arsenit, nach Oxidation als fünfwertiges Arsenat oder nach Metabolisierung als Dimethylarsinsäure (DMAA) oder Monomethylarsonsäure (MMAA)(64).

Die Ursache für die Akkumulation von Kupfer in der Niere nach Arsenverfütterung konnte durch das Studium der vorhandenen Literatur nicht annähernd geklärt werden. Deshalb und auf Grund der Intensität, mit der die Arsen-Kupfer-Wechselwirkung auftrat, wählten wir diese für weitere Untersuchungen aus.

### 5.1.3 Nickel

#### 5.1.3.1 Essentielles oder toxisches Metall ?

In der Literatur wird diskutiert, ob Nickel in geringer Menge von etwa 1 - 5 ppm im Futter für manche Tiere wie Schweine, Ratten und Schafe zu den essentiellen Metallen zu zählen ist (65), da nach der Verfütterung nickelarmer Diäten folgende Symptome auftraten : Störung der Pigmentierung, reduzierter Haematokrit, erhöhte Mortalität, verminderte Gewichtszunahme usw. Allerdings wurde von Nielsen 1985 (7) auf die Bedeutung der Futterzusammensetzung bei der Überprüfung der essentiellen Wirkung eines Elements hingewiesen. Er führte die in der Literatur beschriebenen Mangelercheinungen nicht auf einen Nickelmangel zurück, sondern sprach die Vermutung aus, sie wären eher die Folge von Vitamin- und Eisenmangel.

Die toxische Wirkung von Nickel manifestiert sich erst bei sehr hohen Konzentrationen, weshalb zu ihrer Untersuchung immer relativ hohe Dosen z.B. 5 mg Ni/kg KG i.p. verwendet werden (66).

#### 5.1.3.2 Organverteilung

Da der Hauptanteil des Nickels im Organismus als ultrafiltrierbare Komplexe vorliegt, wird Nickel größtenteils über die Niere ausgeschieden, in der auch die höchste Nickelkonzentration zu finden ist. Nickel führt zu einer Glomerulusschädigung in der Niere (66). Die Resorption von Nickel im Jejunum und der Übergang in den Kreislauf erfolgt sehr schnell. In der Mukosa soll Nickel deshalb nicht zurückgehalten werden (67). Im Gegensatz dazu war das Duodenum in unseren Studien, neben der Niere Hauptzielorgan für das Nickel.

#### 5.1.3.3 Interaktion von Nickel und Kupfer

Interaktionen von Nickel und Kupfer, wie sie durch unsere Untersuchungen deutlich wurden, sind in der Literatur nicht dokumentiert. Von Spears et

al. (68) wurde 1977 berichtet, daß ein Nickelzusatz von 20 mg/kg Diät nur dann zu einer Reduktion der Kupferkonzentrationen in Organen und Geweben führte, wenn diese Diät kupferarm war (0,95 mg/kg Diät). Bei ausreichender Kupferversorgung (mehr als 10 mg/kg Diät) hatten auch 225 mg Nickel/kg Futter noch keine Auswirkung auf die Kupferkonzentrationen von Leber, Milz, Lunge oder Herz, wie das von den selben Autoren 1985 gezeigt wurde (69). Allerdings sind gerade die Niere und der Darm bei dieser Arbeit nicht untersucht worden. Auch unsere Ergebnisse bestätigen, daß bei ausreichender Versorgung mit Kupfer die Leber keine Veränderungen in ihrem Kupfergehalt erfährt, doch der gegensätzliche Effekt von Nickel auf die Kupferwerte in der Niere und im Darm wurde bisher noch nicht beschrieben. Es ist möglich, daß wie von Sunderman et al., 1983 (70) für die Leber und die Niere beschrieben, auch im Darm eine MT-Synthese durch Nickel verursacht wird. Nickel könnte Zink aus anderen Bindungsstellen verdrängen, das dann seinerseits MT induziert. Kupfer, von diesem MT gebunden, könnte vermehrt im Darm akkumuliert werden im Gegensatz zu Nickel, das nicht von MT gebunden wird (71). Warum in unserer Studie die Nieren geringere Kupferkonzentrationen aufwiesen, wenn die Tiere Nickel im Futter erhielten, ist durch die Synthese von MT im Darm nicht erklärbar.

#### 5.1.3.4 Interaktion von Nickel und Eisen

Forth beschrieb 1970 (72) bei eisenarmen Ratten den Durchtritt von Nickel zur Serosaseite im Jejunum in vitro. Verglichen mit eisennormalen Kontrollen waren die Nickelkonzentrationen in der serosalen Flüssigkeit und die Nickelaufnahme in die Mukosa bei eisenarmen Tieren vier- bzw. zweimal höher. Seither war der Einfluß von Nickel auf den Eisenstoffwechsel Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Nielsen et al. (73,74), Schäfer und Forth (75) und Spears et al. (76)). Durch unsere Untersuchungen konnte eine Wechselwirkung von Nickel und Eisen nicht verdeutlicht werden. Wahrscheinlich spielt die sehr kurze Expositionszeit und die sehr gute Versorgung mit allen essentiellen Nahrungsbestandteilen eine ausschlaggebende Rolle.

#### 5.1.3.5 Einfluß von Nickel auf Cadmium und Blei

Die vermehrte Akkumulation von Blei in der Niere bei Nickelverfütterung, wie wir sie in unserem Versuchsansatz feststellten, konnte nicht belegt werden. Die von uns beobachtete vermehrte Retention von Cadmium im Duodenum reiht sich in die Reihe widersprüchlicher Behauptungen ein, die sich in der Literatur für die Ni-Cd-Wechselwirkung finden. Einerseits wird von einer Behinderung der Cadmiumresorption durch Nickel berichtet (67), andererseits soll Nickel eine MT-Synthese anregen (71).

Da aber bei Betrachtung der Literatur klar wird, daß es bei der Studie des Einflusses von Nickel auf andere Metalle, wie bei keinem anderen, auf die Versuchsbedingungen ankommt, sollten man Ergebnisse anderer Autoren immer mit Vorbehalt betrachten und sie nicht ohne weiteres zur Erklärung eigener Befunde heranziehen.

#### 5.1.3.6 Beurteilung der Nickelbelastung

Die Beurteilung der Nickelbelastung ist schwierig, weil ein Biopsiematerial fehlt, in dem sich Nickel dosisabhängig anreichert; das Blut zeigte keine dosisabhängige Nickelkonzentrationen, und Nieren- sowie Darmproben sind als Biopsiematerial nur schwer zu erhalten. Außerdem ist es möglich, daß andere aufgenommene Metalle zu falschen Schlußfolgerungen führen können. Eine Urinuntersuchung könnte eine Belastung mit Nickel anzeigen.

#### 5.1.4 Blei

##### 5.1.4.1 Organ- bzw. Gewebeverteilung

Bei unseren Untersuchungen akkumulierte Blei hauptsächlich, wie auch in der Literatur beschrieben (77), in der Niere und im Knochen, während die Leber und das Blut eine unbedeutende Rolle bei der Organverteilung von Blei spielten. Dies steht im Gegensatz zu Arbeiten von Tandon et al.,

1985 (78) und Oskarsson 1985 (79). Da Blei gut nierengängig ist, sollte es auch im Urin nachweisbar sein. Doch konnte aus den schon beschriebenen Gründen der Urin nicht zur Analyse verwendet werden.

#### 5.1.4.2 Einfluß von Blei auf essentielle Metalle

Hinsichtlich Interaktionen mit essentiellen Metallen war Blei wesentlich weniger effizient als Arsen, Cadmium und Nickel. Obwohl in der Literatur, ähnlich wie für Cadmium, sowohl eine vermehrte Resorption von Blei im Eisenmangel (80,81), als auch eine Reduktion der Eisenwerte bei einer Bleiexposition in Leber, Niere, Darm und Gehirn beschrieben ist (82) zeichnete sich bei unseren Studien ein derartiger Effekt nicht ab. Allerdings trat diese Interaktion erst nach 19 Tagen Fütterung in Erscheinung. Von Wechselwirkungen mit anderen essentiellen Metallen sollen laut Literatur Leber, Niere, Darm usw. ebenso betroffen sein (82).

#### 5.1.4.3 Interaktion von Blei und Arsen

Die einzige Interaktion, die unter unseren Versuchsbedingungen auftrat, war die Verminderung des Arsengehalts im Knochen bei steigendem Bleigehalt der Diät, während die Kalziumkonzentration unbeeinflusst blieb. Publikationen zu diesem Phänomen existieren nicht. Eine Erklärung dafür könnte die Verknüpfung des Blei-, Kalzium- und Phosphatstoffwechsels im Knochen (83) und die Ähnlichkeit von Arsenat und Phosphat sein. Über den Mechanismus dieser Interaktion gibt es keinerlei Hinweise.

#### 5.1.5 Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für den Menschen

Tierexperimentelle Befunde auf die Situation des Menschen zu übertragen, ist immer mit Schwierigkeiten behaftet, zumal dann wenn wie in unserem Fall mit der Ratte nur eine Tierspezies untersucht wurde und die

Versuchsdauer nur zwei Wochen betrug. Studien über einen längeren Zeitraum sind nötig, waren aber bei unserem Versuchsansatz nicht sinnvoll durchführbar. Da akute Intoxikationen mit Arsen, Cadmium, Nickel und Blei in der Regel nicht auftreten, ist die tägliche Nahrungsaufnahme und die Inhalation die Quelle einer chronischen Belastung mit toxischen Metallen. Um auf die Schwermetallbelastung der Bevölkerung schließen zu können, die über lange Zeit oft geringen Metallkonzentrationen ausgesetzt ist, ist die Untersuchung von Gewebeproben aller Altersgruppen aus dem Leichenbestand notwendig. Unsere Ergebnisse können jedoch Hinweise auf mögliche Interaktionen von Metallen beim Menschen darstellen, die den Belastungszustand mit toxischen Metallen beeinflussen.

Wie unsere Studien zeigten, unterscheiden sich die untersuchten Metalle hinsichtlich ihres Vermögens, Interaktionen mit essentiellen Metallen zu bewirken. Cadmium und Arsen erwiesen sich auch in niedrigen Dosen schon als sehr effizient. Blei und Nickel dagegen waren nur in sehr hohen Konzentrationen zu Wechselwirkungen mit anderen Metallen fähig. Da der Mensch jedoch immer mehreren Metallen gleichzeitig ausgesetzt ist, könnte man sich vorstellen, daß Arsen und Cadmium den Spurenelementhaushalt so nachhaltig beeinflussen, so daß auch Nickel und Blei vermehrt resorbiert werden und ihre Wirkung entfalten können. Deshalb sollte der ausreichenden Versorgung mit essentiellen Metallen große Beachtung geschenkt werden. Dabei ist nicht nur der absolute Gehalt der Lebensmittel an Eisen, Kupfer, Mangan und Zink wichtig, sondern auch deren Bioverfügbarkeit d.h. in welchen Mengen aufgenommene Metalle resorbiert werden und, im Körper verteilt, ihre physiologische Wirkung ausüben können (84). Verschiedene Faktoren können die Bioverfügbarkeit von z.B. Eisen beeinträchtigen wie Coffein, Sojaprodukte, Milch usw. (85). Auch die Bioverfügbarkeit toxischer Metalle kann beeinflußt sein (86,87). In diesem Zusammenhang wichtig sind auch unterschiedliche Lebens- und Ernährungsgewohnheiten. Raucher z.B. müssen mit einer deutlich höheren Cadmiumbelastung rechnen als Nichtraucher (86). Auch bei anderen Risikogruppen, wie z.B. bei Frauen mit chronischem Eisenmangel, ist eine erhöhte Aufnahme von toxischen Metallen aus der Nahrung zu erwarten.

## 5.2 Zeitstudie

Diese Untersuchung diente zur Überprüfung der Frage, ob es sich bei der Arsen-Kupfer-Interaktion in der Niere der Ratte um einen zunehmenden, anhaltenden oder vorübergehenden Einfluß des Arsens auf die renalen Kupferkonzentrationen handelt. Außerdem sollte geklärt werden, in welcher Proteinfraction sich das Kupfer anreichert.

### 5.2.1 Metallkonzentrationen in der Niere

#### 5.2.1.1 Arsenkonzentrationen

Ein Vergleich der Arsenkonzentrationen in Nierenmark und -rinde mit denen der Blutzellen in Abhängigkeit der Zeit und dem Arsengehalt der Diäten erbringt eine deutliche Parallele. Die Bestimmung des Restblutgehalts in der Nierenrinde und die damit ermöglichte Abschätzung des Arsengehalts, machte klar, daß früher oder später die Bedeutung der Blutverunreinigung für die Arsenbestimmung zunahm, je nachdem wann das Maximum der Arsenakkumulation in den Blutzellen erreicht wurde. Aber auch nach Abzug des Arsengehalts, der durch die Blutkontamination verursacht wurde, bleiben Arsenkonzentrationen im Nierengewebe, die diese Beziehung noch erkennen lassen. Wahrscheinlich ist die Arsenmenge, die vom Blut an das Nierengewebe abgegeben wird, unmittelbar verbunden mit der Arsenkonzentration im Blut, passiert doch die gesamte Blutmenge vielfach am Tag die Niere.

#### 5.2.1.2 Kupferkonzentrationen

Die Kupferakkumulation erfolgte ausschließlich in der Nierenrinde und zwar dann, wenn sich Arsen im Rindengewebe anreicherte, d.h. bei hohem Arsengehalt im Futter früher als bei niedrigem. Im Gegensatz zur Pilotstudie, bei der männliche Ratten Verwendung fanden, war bei den weiblichen Tieren die Kupferanreicherung bei weitem nicht so ausgeprägt. Dies führen wir auf geschlechtspezifische Unterschiede zurück

(88). Die Parallele der Arsen- und Kupferanreicherung in der Nierenrinde läßt die Vermutung zu, daß die Nierenfunktion durch Arsen, über einen noch unbekannten Mechanismus, beeinflußt wird. In der Nierenrinde finden sich die Glomeruli, durch die das Blut ultrafiltriert wird, wodurch der Primärharn entsteht, und die proximalen Tubuli, die für die Rückresorption von Elektrolyten und Proteinen aus dem Primärharn verantwortlich sind (89). Möglich wäre einerseits eine Schädigung der Glomeruli und damit verbunden eine erhöhte Filtration von höhermolekularen Proteinen. Neben anderen könnte Ceruloplasmin (MG: ca. 130 kD) ultrafiltriert werden und in den Tubuli Kupfer abgeben. Andererseits könnten in intakten Glomeruli Arsen und Kupfer filtriert werden und anschließend in den Tubuli verstärkt resorbiert werden. Wie der Mechanismus im einzelnen abläuft, ist unbekannt.

#### 5.2.1.3 Cadmiumkonzentrationen

Cadmium reicherte sich wie Kupfer ebenfalls hauptsächlich in der Nierenrinde an, doch anscheinend völlig unabhängig von der Kupferakkumulation. Dieser Befund ist unerwartet, da sowohl Cadmium als auch Kupfer in der Nierenrinde MT induzieren könnten, das die verstärkte Akkumulation der beide Metalle verursachen könnte (s. Literatur 5.1.1.1).

#### 5.2.2 Biochemische Untersuchung der Homogenatüberstände

Schwermetalle treten im Organismus nicht als freie Kationen auf, sondern liegen komplexiert vor. Proteine, aber auch niedermolekulare Verbindungen kommen hierfür als Komplexliganden in Frage. Die löslichen Bestandteile des Cytosols sollten nach einer Fraktionierung auf ihren Metallgehalt hin untersucht werden.

Folgende Hinweise zeigen, daß es sich bei dem Protein, das bei der Gelfiltration bei einem Molekulargewicht von ca. 13 KD erschien, wahrscheinlich um Metallothionein (MT) handelte :

1. Diese Proteinfraktion ist hitzestabil
2. In dieser Fraktion eluierten sowohl Cadmium als auch Kupfer
3. Rechromatographie dieser Fraktion an der HPLC ergab einen Peak der mit Rattenleber-MT cochromatographierte.
4. Vergleichende Disk-Elektrophorese von MT 1+2 mit hitzedenaturierten Homogenatüberständen ergab eine Bande mit gleichem Rf-Wert wie MT 2.

Unser Ergebnis, daß der Hauptanteil des Kupfers im Cytosol von Kontrollen mit MT assoziiert war, steht in Einklang mit der Arbeit von Brady et al., 1981 (90), in der MT von Ratten ab dem 25. Lebenstag als hauptsächlich kupferhaltiges Protein bezeichnet wird.

Bei dem kupferhaltigen Protein mit ca. 30 KD, das bei unseren Untersuchungen in geringen Mengen auftrat, handelte es sich wahrscheinlich um die Superoxiddismutase.

Wie in der Literatur beschrieben (91), fand sich Arsen nicht in der MT-Fraktion. Auch die Vermutung, Arsen verursache eine MT-Induktion und bewirke so die Kupferakkumulation in der Niere, die auf Grund dessen, was in der Literatur behauptet (92), unwahrscheinlich war, konnte nicht bestätigt werden. Deshalb ist es ungewöhnlich, daß das überschüssige Kupfer der Tiere der Basis- und der As-II Gruppen ausschließlich in der MT-Fraktion vorlag. Eine rechnerische Kontrolle, welcher MT-Gehalt vorhanden sein mußte, um alles Kupfer und auch das Cadmium dieser Fraktion zu binden, ergab einen Wert von ca. 80-100 µg/g F.G., der in etwa mit Angaben in der Literatur von 68 µg/g übereinstimmt (93). Hinweise, daß MT als Speicher für das vermehrte Kupfer dienen könnte, ergeben sich aus den Arbeiten von Danks et al. (94) und Packman et al. (95), die sich beide dem Menkes' Kinky Hair Syndrome (deutsch etwa Menke's "Korkenzieherhaarsyndrom") beschäftigten. Hierbei handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der u.a. der Kupferstoffwechsel gestört ist; die Lebenserwartung der Betroffenen beträgt nur ca. 3-4 Jahre. Die Störung des Kupferstoffwechsels äußert sich in abnormal hohen Kupferwerten in den Nieren, im Duodenum, in der Lunge und im Urin bei gleichzeitiger Reduktion der Kupferkonzentrationen in der Leber und im Plasma. MT wird eine entscheidende Rolle bei der

Kupferakkumulation in der Niere zugesprochen. Erwähnenswert ist darüber hinaus die Feststellung von Packman, daß keine erhöhte Affinität zur Bindung von Zink und Cadmium in der Niere zu erkennen sei. Diese Beobachtung für das Cadmium konnten wir bei unseren Untersuchungen auch machen. Die Cadmiummenge, die mit dem Kupfer cochromatographierte war bei den Proben der Basis- und der As-II Gruppe etwa identisch. Alle Ergebnisse weisen darauf hin, daß in allen Tieren nur der natürliche MT-Gehalt in der Niere vorhanden ist, obwohl sich durch die verschiedenen Kupfergehalte unterschiedliche MT-Mengen finden lassen müßten. Kupfer ist ein potentieller Induktor von MT (96) und da MT, wie andere Proteine, einer ständigen Regeneration unterworfen ist, müßten die unterschiedlichen Kupfergehalte der Kontrollen und der Basis- bzw. As-II Gruppen zu einer unterschiedlich starken MT-Induktion in der Niere führen. Da das nicht der Fall war, oder besser gesagt mit den angewandten Analysemethoden von uns nicht nachzuweisen war, kann als wahrscheinlich angenommen werden, daß MT bei der Kupferakkumulation nur als Speicher dient und nicht als Vehikel mit dem Kupfer in die Niere gelangt.

Die Beobachtung, daß auch der Cadmiumgehalt der Basis- und der As-II Diät von 11 mg/Kg über 15 Wochen nicht ausreichte, um in der Niere den MT-Gehalt deutlich gegenüber den Kontrollen zu erhöhen, hängt entweder mit der ungenügenden Empfindlichkeit der Methoden, geringe Unterschiede aufzudecken zusammen, oder die tatsächlich in der Niere angekommene Cadmiummenge ist zu einer Induktion nicht ausreichend. Daß die Niere hinsichtlich einer MT-Synthese wesentlich träger ist als die Leber, zeigten Cempel et al. (97). Nach der Applikation von 1,6 mg Cd/Kg KG, i.v., ließ sich nach 48 h in der Niere kein zusätzliches MT nachweisen, obwohl in der Leber und auch in der Niere eine rasche Cadmiumakkumulation festzustellen war, und zu diesem Zeitpunkt die MT-Synthese in der Leber schon abgeschlossen war (97).

### 5.3 Urinuntersuchungen

#### 5.3.1 Arsen- und Kupferkonzentrationen

Arsen wird in der Leber metabolisiert und schon nach dem 1.Tag einer Arsenexposition hauptsächlich als DMAA (Dimethylarsinsäure) über die Nieren ausgeschieden (64,98). Bei der Ratte liegt DMAA im Blut an das Hämoglobin gebunden vor, obwohl DMAA sonst nicht mit Makromolekülen assoziiert (64). Je schneller die roten Blutzellen mit Arsen gesättigt sind, also bei höherem Arsengehalt der Diät früher als bei niedrigem (s. 4.2.3), desto eher müßten die Arsenkonzentrationen im Nierengewebe ansteigen und auch die Arsenausscheidung erhöht sein. Für das Nierengewebe ließ sich diese Spekulation durch unsere Ergebnisse bestätigen, doch für der Ausscheidung nur teilweise. Die Tiere der As-III Gruppe schieden bis zum 8. Tag steigende Mengen Arsen aus. Von diesem Zeitpunkt an erhöhte sich die Arsenexkretion nicht mehr. Der Urin der Basisgruppentiere enthielt über den ganzen Beobachtungszeitraum immer annähernd gleich viel Arsen.

Das Auftreten der As-Cu-Interaktion ausgerechnet in der Niere, dem Ausscheidungsorgan des Körpers, unterstreicht die Berechtigung der Vermutung einer Beeinflussung der Kupferausscheidung durch Arsen. Doch sowohl die schnelle Verringerung der Kupferausscheidung, als auch das Fehlen eines Unterschiedes zwischen der Basis- und der As-III Gruppe nach dem 1. und 2.Tag ist überraschend.

Aus der Literatur ist bekannt, daß nach der i.v. Applikation von radioaktivem Kupfer schon nach zwei Tagen im Urin keine Radioaktivität mehr nachzuweisen war (99). Die Kupferexkretion kann also sehr rasch neuen Bedingungen angepaßt werden. Ob der Reaktion auf eine von außen bedingte Kupferanflutung und der Regulation der Kupferausscheidung nach Arsenapplikation ein gemeinsamer Regelmechanismus zu Grunde liegt, kann nur vermutet werden. Wichtig ist hierbei, daß die verminderte Kupferausscheidung der Kupferakkumulation voranging. Doch läßt sich allein dadurch die Anhäufung von Kupfer in der Niere nicht quantitativ erklären, da die verminderte Exkretion schätzungsweise nur 16 - 25 % zur Kupferakkumulation in den Nieren der As-III Gruppe beitrug.

Wie durch Arsen der Kupferhaushalt beeinflusst wird, und welche Faktoren außerdem eine Rolle spielen, ist durch unsere Studien nicht zu erklären. Vorstellbar ist eine Bedeutung des Gastrointestinaltraktes, für den in der Zeitstudie stellvertretend nur das Duodenum analysiert wurde, und hier auch nur der Kupfergehalt, nicht die Resorption.

### 5.3.2 Nierenfunktion

Die Messung der alkalischen Phosphatase (AP) diente zur Prüfung auf eine Schädigung der proximalen Tubuli; die SDS-Elektrophorese zur Funktionsprüfung der Glomeruli (100).

Durch unsere Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Nieren im Verlauf von 14 Tagen einer Arsenfütterung von bis zu 60 mg/Kg Diät keine so nachweisbare Schädigung davontrugen, also wahrscheinlich voll funktionstüchtig waren. Die vorgestellten Ergebnisse sind daher wohl nicht die Folge toxischer, sondern physiologischer Wirkungen des Arsens.

#### 5.4 Hypothesen zur Ursache der Kupferanreicherung in der Niere

Es ist davon auszugehen, daß Arsen in der Leber metabolisiert wird und auch bei unseren Untersuchungen im Blut und in vielen Organen bzw. Geweben methylierte Arsenverbindungen auftreten. Diese Metaboliten können im Blut zu den Nieren gelangen, werden dort in den Glomeruli filtriert und mit dem Urin ausgeschieden (64,98). Da die Arsenakkumulation im Nierengewebe die Voraussetzung für die renale Kupferanreicherung ist, ist ein Transport von Kupfer zu den Nieren durch einen dieser Metaboliten oder einen gemeinsamen Liganden denkbar. Die Möglichkeit, daß Arsen und Kupfer gemeinsam in die Niere gelangen, liegt auch deshalb nahe, da die Parallele der Arsen- und Kupferanreicherung in der Niere und das konstante molare Verhältnis von Arsen und Kupfer auffällig ist (s.5.1.2.2). Nach der Ultrafiltration erfolgt die Rückresorption des postulierten "Kupfer-Arsenmetaboliten-Komplexes" in die proximalen Tubuluszellen, in denen dieser Komplex dissoziiert und Kupfer an das vorhandene Metallothionein abgibt (s. 5.2.2). Die Möglichkeit, daß neben Elektrolyten auch niedermolekulare Verbindungen rückresorbiert werden, ist gegeben. Selbst Cd-MT wird in den Tubuli rückresorbiert. MT ist in unserem Fall nicht die Ursache der Kupferanreicherung, sondern spielt nur eine sekundäre Rolle. Die Rückresorption des Kupfers in Verbindung mit dem Arsenmetaboliten ist effektiver als in Abwesenheit von Arsen. Deshalb ist die Kupferausscheidung in den Urin verringert (s. 5.3.1). Auch vorstellbar sind durch Arsen bedingte Veränderungen in der Niere, die die verstärkte Aufnahme von Kupfer in die Tubuluszellen zur Folge haben.

Die physiologischen Bedingungen in der Niere müssen ausschlaggebend dafür sein, daß nur in der Nierenrinde oder in den Tubuli selbst der Komplex dissoziiert und deshalb auch nur hier die Kupferakkumulation stattfindet. Abschließend sei nochmals darauf hingewiesen, daß dieser Effekt auf das Kupfer beschränkt ist. Andere Metalle wie z.B. Cadmium und Zink werden bei Arsenverfütterung nicht verstärkt in der Niere akkumuliert. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß Kupfer in der Oxidationsstufe +1 in stabilen Komplexen auftreten kann. Hierin unterscheidet es sich von den anderen untersuchten Metallen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In Fütterungsversuchen mit Ratten wurde der Einfluß der verabreichten toxischen Metalle Arsen, Cadmium, Nickel und Blei auf die Organ- bzw. Gewebegehalte der essentiellen Metalle Kupfer, Eisen, Mangan und Zink untersucht. Die Basisdiät enthielt einen Grundgehalt aller vier toxischen Metalle; in den Testdiäten I - IV wurde die Konzentration eines toxischen Metalls stetig erhöht, während die der drei anderen beibehalten wurde. Die Versorgung mit essentiellen Metallen war mehr als ausreichend.

Folgende Interaktionen konnten festgestellt werden:

|         |            |       |            |
|---------|------------|-------|------------|
| Arsen   | Leber      | As ↑  | Cu ↓       |
|         | Niere      | As ↑  | Cu ↑       |
|         | Darm       | As ↑  | Mn ↓       |
|         | Plasma     | As ↑  | Cu ↓       |
|         | Blutzellen | As ↑  | Cu ↓       |
| Cadmium | Leber      | Cd ↑  | Fe ↓, Zn ↑ |
|         | Niere      | Cd ↑  | Fe ↓       |
|         | Darm       | Cd ↑  | Fe ↓, Mn ↓ |
|         | Knochen    | (Cd)↑ | Fe ↓, Zn ↓ |
|         | Haut       | (Cd)↑ | Fe ↓       |
| Nickel  | Niere      | Ni ↑  | Pb ↑, Cu ↓ |
|         | Darm       | Ni ↑  | Cu ↑, Cd ↑ |
| Blei    | Knochen    | Pb ↑  | As ↓       |

Metall : Steigerung des Metallgehalts der Diät und im Gewebe  
 (Metall) : Steigerung des Metallgehalts der Diät, jedoch im Gewebe mit den verwendeten Analysenmethoden nicht nachweisbar

Weitere Untersuchungen der As-Cu-Interaktion in der Niere ergaben :

- Die Kupferakkumulation trat nur in der Nierenrinde auf.
- Bei hohem Arsengehalt der Diät war der Kupferanstieg früher erkennbar als bei niedrigem.
- Cadmium reicherte sich unabhängig vom Arsen und Kupfer auch in der Nierenrinde an.
- Schon bei den Kontrollen lag der Hauptanteil des Kupfers im Cytosol an MT gebunden vor. Auch das überschüssige Kupfer der Basisgruppen und der As-II Gruppen fand sich in dieser Proteinfraction.
- Unsere Studien zeigten keinen quantitativen Unterschied im MT-Gehalt nach Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt.
- Die Niere wurde durch unsere Arsendiäten nicht geschädigt.
- Die urinäre Kupferausscheidung bei den Tieren der Basis- und der As-III Gruppe verminderte sich nach dem 1. und 2.Tag um 50-70%. Diese Reduktion blieb bei der As-III Gruppe abgeschwächt bis zum 14.Tag erhalten.
- Im Gegensatz zur As-III Gruppe stieg die Arsenausscheidung der Basis-Gruppe zwischen dem 2. und 14.Tag nicht weiter an.

Vermutliche Ursache für die Kupferakkumulation in der Niere:

bei Fütterung von Basisdiät (7,5 mg As/kg Diät) und As-I bis As-IV (15 - 120 mg As/kg Diät)

- 50 - 17 % durch Umverteilung aus Leber, Plasma und Blutzellen
- 50 - 16 % durch verminderte, urinäre Kupferexkretion
- Der Rest unbekannter Herkunft; vielleicht durch Umverteilung aus dem gesamten Gastrointestinaltrakt oder durch gesteigerte Resorption

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Jones H. S, Fowler B. A.  
Biological Interactions of Cadmium with Calcium.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 309 - 318 (1980)
- (2) Schäfer S. G., Forth W.  
Cadmium - Bewertung eines Schadstoffs.  
Dt. Ärzteblatt 43 : 39 - 57 (1982)
- (3) Pollack S., George J. N., Reba R. C., Kaufman R., and Crosby W. H.  
The Absorption of Non-Ferrous Metals in Iron Deficiency.  
J. Clin. Invest. 44 : 1470 - 1473 (1965)
- (4) Forth W.  
Intestinale Resorption von Eisen und chemisch verwandten Metallen.  
Handbuch der inneren Medizin, Band III/3A, Caspary W. F. (Ed.)  
Springer Verlag, Berlin 267 - 297 (1983)
- (5) Van Barneveld A. A., Van Den Hamer C. J. A.  
Influence of Ca and Mg on the Uptake and Deposition of Pb and Cd  
in Mice.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 79 : 1 - 10 (1985)
- (6) Davis G. K.  
Microelement Interactions of Zinc, Copper, and Iron in Mammalian  
Species.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 130 - 139 (1980)
- (7) Nielsen F. H.  
The Importance of Diet Composition in Ultratrace Element Research.  
J. Nutr. 115 : 1239 - 1247 (1985)
- (8) Sandstead H. H.  
Interactions of Toxic Elements with Essential Elements:  
Introduction.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 282 - 284 (1980)
- (9) Petering H. G.  
The Influence of Dietary Iron and Copper on the Biologic Effects  
of Orally Ingested Lead.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 298 - 308 (1980)
- (10) Mahaffey K. R.  
Metabolic Interactions : Lead, Calcium and Iron.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 285 - 297 (1980)
- (11) Bremner I., Campbell J. K.  
The Influence of Dietary Copper Intake on the Toxicity of Cadmium.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 355 : 319 - 331 (1980)

- (12) Reichlmayr-Lais A. M., Kirchgessner M., Mathur A. K.  
Zn- und Ni- Konzentration in Organen und Geweben von Ratten nach unterschiedlicher Zn- und Ni- Versorgung.  
Z. Tierphys. 53 : 207 - 213 (1985)
- (13) Kirchgessner M., Reichlmayr-Lais A. M., Mathur A. K.  
Fe-, Cu-, und Mn- Konzentration in ausgewählten Organen und Geweben von Ratten nach unterschiedlicher Zn- und Ni- Versorgung.  
Z. Tierphys. 53 : 214 - 222 (1985)
- (14) Mahaffey K. R., Capar S. G., Gladen B. C. and Fowler B. A.  
Concurrent Exposure to Lead, Cadmium and Arsenic.  
J. Lab. Clin. Med. 98 (4) : 265 - 281 (1981)
- (15) Stelz A.  
Serienmäßige Bestimmungen von Blei und Cadmium in der Muskulatur und in Innereien von Schlachttieren durch offenen Naßaufschluß und Zeeman AAS.  
Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 41 : 110 - 112 (1987)
- (16) Greenfield H., and Briggs G. M.  
Nutritional Methodology in Metabolic Research with Rats.  
Annu. Rev. Biochem. 40 : 549 - 572 (1971)
- (17) Bowen H. J. M.  
Environmental Chemistry of the Elements.  
Academic Press, New York (1979)
- (18) Iyengar G. V.  
Autopsy Sampling and Elemental Analysis: Errors Arising from Post-Mortem Changes.  
J. Pathology 134 : 173 - 180 (1981)
- (19) Behne D.  
Sources of Error in Sampling and Sampling Preparation for Trace Elements Analysis in Medicine.  
J. Clin. Chem. 19 : 115 - 120 (1981)
- (20) Merian E.  
Metalle in der Umwelt.  
Verlag Chemie, Weinheim (1984)
- (21) Moody J. R., Lindstrom R. M.  
Selection and Cleaning of Plastic Containers for Storage of Trace Element Samples.  
Analyt. Chem. 49 (14) : 2264 - 2267 (1977)
- (22) Dahlquist R. L., Knoll J. W.  
Inductively Coupled Plasma-Atomic-Emission Spectrometry: Analysis of Biological Materials and Soils for Major, Trace and Ultra-Trace Elements.  
Appl. Spectr. 32 (1) : 1 - 29 (1978)

- (23) Schrader W., Grobanski Z., Schulze H.  
Einführung in die AES mit dem induktiv gekoppelten Plasma (ICP).  
Firmenschrift Perkin-Elmer, Überlingen
- (24) Versieck J.  
Trace Element Analysis - A Plea for Accuracy.  
Tr. El. Med. 1 (1) : 2 - 12 (1984)
- (25) Piscator M.  
Validity of Methods for Metal Determination in Exposure Media and  
Biological Materials.  
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp 172 - 183  
(1976)
- (26) Zeisler R., Harrison S. H., Wise S. A  
Trace Elements in Human Livers Using Quality Control in the  
Complete Analytical Process.  
Biol. Tr. El. 6 : 31 - 49 (1984)
- (27) Boumans P. W. J. M.  
Line Coincidence Tables for Inductively Coupled Plasma Atomic  
Emission Spectrometry.  
Pergamon Press, Oxford (1984)
- (28) Katz S. A.  
Collection and Preparation of Biological Tissues and Fluids for  
Trace Element Analysis.  
Int. Biotech. Lab. 2 (3) : 10 -16 (1985)
- (29) Andrews P.  
Estimation of Molecular Size and Molecular Weights of Biological  
Compounds by Gel Filtration.  
Meth. Biochem. A. 18 : 1 - 53
- (30) Copper T. G.  
Biochemische Arbeitsmethoden.  
De Gruyter Verlag, Berlin (1981)
- (31) Gel Filtration, Theory and Practice.  
Firmenschrift Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden (1979)
- (32) Laurent T. C., Killander J.  
A Theory of Gel Filtration and its Experimental Verification.  
J. Chromatogr. 14 : 317 - 330 (1964)
- (33) Kägi J. H. R., Vallee B. L.  
MT, a Cadmium and Zinc- Containing Protein from Equine Renal  
Cortex.  
J. Biol. Chem. 235 : 3460 - 3465 (1960)
- (34) Gabriel O.  
Analytical Disc Gel Elektrophoresis.  
Meth. Enzym. 22 : 565 - 578 (1971)

- (35) Mancini G., Carbonara A. O., Herlmans J. F:  
Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial  
Immunodiffusion.  
Immunochem. 2 : 235 - 254 (1965)
- (36) Laemmli U. K.  
Cleavage of the Structural Proteins During the Assembly of the  
Head of Bacteriophage T4.  
Nature 227 : 680 - 685 (1970)
- (37) Sachs L.  
Angewandte Statistik  
Springer Verlag, Berlin (1983)
- (38) Mattenheimer H., Enzyme im Urin, in Methoden der enzymatischen  
Analyse (H.U. Bergmeyer ed.), pp  
Verlag Chemie, Weinheim 1974
- (39) Lehman L. D., Klaassen C. D.  
Dosage-Dependent Disposition of Cadmium Administered Orally to  
Rats.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 84 : 159 - 167 (1986)
- (40) Cherian M. G., Gayer R. A., Valberg L. S.  
Gastrointestinal Absorption and Organ Distribution of Oral Cadmium  
Chloride and Cadmium-MT in Mice.  
J. Tox. Env. H. 4 : 861 - 868 (1978)
- (41) Thomas R. G., Wilson J. S., London J. E.  
Multispecies Retention Parameters for Cadmium.  
Envir. Res. 23 : 191 - 207 (1980)
- (42) Sabbioni E., Marafante E., Amantini L., Ubertall L., Pietra R.  
Cadmium Toxicity Studies under Long Term - Low Level Exposure  
Conditions.  
Sci. Total Envir. 10 : 135 - 161 (1978)
- (43) Chowdhury P., Inoue K., Chang L. W. and Rayford P. L.  
Distribution and Retention of Cadmium<sup>109</sup> by the Gastrointestinal  
Tract and Other Organs Following Intraperitoneal Cadmium Exposure.  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31 : 399 - 406 (1983)
- (44) Chowdhury P., Chang L. W., Rayford P. L.  
Catabolism and Tissue Distribution of Cd<sup>109</sup> in Rats.  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31 : 391 - 398 (1983)
- (45) Nordberg G. F., Engström B.  
Factors Influencing Absorption and Retention of Oral <sup>109</sup>Cd in  
Mice: Age, Pretreatment and Subsequent Treatment with  
Non-Radioactive Cadmium.  
Acta Pharmacol. Toxicol. 45 : 315 - 324 (1979)

- (46) Suzuki Y., Yoshikawa H.  
Induction of Hepatic Zinc-Binding Proteins of Rats by Various Metals.  
Ind. H. 14 : 25 - 31 (1976)
- (47) Eaton D. L., Wong K. L., KLaassen C. D.  
Dose-Response Effects of Various Metal Ions on Rat Liver Metallothionein, Glutathion, Heme Oxygenase, and Cytochrom P-450  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 55 : 393 - 402 (1980)
- (48) Piotrowski J. K., Trojanowska B., Wisniewska Knypl J. M., and Balanowska W.  
Mercury Binding in the Kidney and Liver of Rats Repeatedly Exposed to Mercuric Chloride : Induktion of MT by Mercury and Cadmium  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 27 : 11 - 19 (1974)
- (49) Rader J. J., Wolnik K. A., Gaston C. M., Celesk E. M., Peeler J. T., Spivey Fox M. R. and Fricke F. L.  
Trace Element Studies in Weanling Rats: Maternal Diets and Baseline Tissue Mineral Values.  
J. Nutr. 114 : 1946 - 1954 (1984)
- (50) Sugawara N., Sugawara Ch. and Miyake H.  
Effects of Subcutaneous and Oral Cadmium on Iron Metabolism: Role of Ceruloplasmin and Metallothionein.  
Arch. Toxicol. 56 : 25 - 28 (1984)
- (51) Stonard M. D., Webb M.  
Influence of Dietary Cadmium on the Distribution of the Essential Metals Copper, Zinc and Iron in Tissues of the Rat.  
Chem.- Biol. In. 15 : 349 - 363 (1976)
- (52) Pindborg E. V., Pindborg J. J., Plum C. M.  
The Relation between Cadmium Poisoning and Iron Metabolism  
Acta Pharmacol. Toxicol. 2 : 302 - 306 (1946)
- (53) Hamilton D. L., Valberg L. S.  
Relationship between Cadmium and Iron Absorption.  
Am. J. Physiol : 227 (5) : 1033 - 1037 (1974)
- (54) Valberg L. S., Sorbie J., Hamilton D. L.  
Gastrointestinal Metabolism of Cadmium in Experimental Iron Deficiency.  
Am. J. Physiol. 231 (2) : 462 - 467 (1976)
- (55) Leon L., Johnson D. R.  
Role of Iron in Jejunal Uptake of Cadmium in the Newborn Rat.  
J. Tox. Env. H. 15 : 687 - 696 (1985)
- (56) Lamphere D. N., Dorn C. R., Reddy C. S. and Meyer A. W.  
Reduced Cadmium Body Burden in Cadmium-Exposed Calves Fed Supplemental Zinc.  
Envir. Res. 33 : 119 - 129 (1984)

- (57) Chmielnicka J., Cherian M. G.  
Environmental Exposure to Cadmium and Factors Affecting  
Trace-Element Metabolism and Metal Toxicity.  
Biol. Tr. El. 10 : 243 - 262 (1986)
- (58) Sarhan M. J., Roels H., Lauwery R., Reyners H. and De Reyners E.G.  
Influence of Manganese on the Gastrointestinal Absorption of  
Cadmium in Rats.  
J. Appl. Toxicol. 6 : 313 - 316 (1986)
- (59) Goering P. L., Klaassen C. D.  
Mechanism of Manganese-Induced Tolerance to Cadmium Lethality  
and Hepatotoxicity.  
Bioch. Pharm. 34 (9) : 1371 - 1379 (1985)
- (60) Marafante E., Rade J., Pietra R., Sabbioni E., and Bertolero F.  
Metabolic Fate of Inorganic Arsenic in Laboratory Animals  
3. Spurenelement-Symposium Arsen, Jena (1980)
- (61) Hunter F. T., Kip A. F., Irvine Jr. J. W.  
Radioactive Tracer Studies on Arsenic Injected as Potassium  
Arsenite  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 76 : 207 - 220 (1942)
- (62) Maehashi H., Yamaguchi Y., Tsutsumi S.  
Arsenic and Copper Excretion after Treatment of Arsenic Poisoning  
in Rats with Heavy-Metal Antagonists.  
Dev. Sci. Pract. Toxicol. 11 : 325 - 328 (1983)
- (63) Oladimeji A. A.  
An Arsenic Binding Protein in Rainbow Trout.  
Ecotox. Env. 9 : 1 - 5 (1985)
- (64) Marafante E., Vahter M., Envall J.  
The Role of the Methylation in the Detoxication of Arsenic in  
the Rabbit.  
Chem. - Biol. In. 56 : 225 - 238 (1985)
- (65) Spears J. W.  
Nickel as a "Newer Trace Element" in the Nutrition of Domestic  
Animals.  
J. Anim. Sci. 59 (3) : 823 - 835 (1984)
- (66) Gitlitz P. H., Sunderman F. W., Goldblatt P. J.  
Aminoaciduria and Proteinuria in Rats after a Single  
Intraperitoneal Injection of Ni(II).  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 34 : 430 - 440 (1975)
- (67) Foulkes E. C., Mc Mullen D. M.  
On the Mechanism of Nickel Absorption in the Rat Jejunum.  
Toxicology 38 : 35 - 42 (1986)

- (68) Spears J. W., Hatfield E. E., Forbes R. M.  
Nickel-Copper Interrelationship in the Rat.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156 : 140 - 143 (1977)
- (69) Spears J. W., Hatfield E. E.  
Interaction between Nickel and Copper in the Rat.  
Biol. Tr. El. 7 : 183 - 191 (1985)
- (70) Sunderman Jr. F. W., Fraser C. B.  
Effects of Nickel Chloride and Diethyldithiocarbamate on  
Metallothionein in Rat Liver and Kidney.  
Ann. Clin. Lab. 13 (6) : 489 - 495 (1983)
- (71) Oskarsson A., Tjälve H.  
Binding of Ni63 by Cellular Constituents in Some Tissues of Mice  
after the Administration of  $^{63}\text{NiCl}_2$  and  $^{63}\text{Ni}(\text{Co})_4$ .  
Acta. Pharmacol. Toxicol. 45 : 306 - 314 (1979)
- (72) Forth W.  
Absorption of Iron and Chemically Related Metals in vitro and  
in vivo; The Specificity of Iron Binding System in the Intestinal  
Mucosa of the Rat.  
in Trace Element Metabolism in Animals, C.F. Mills (Ed), E & S'  
Livingstone, Edinburgh, London (1970)
- (73) Nielsen F. H., Shuler T. R., Mc Lead T. G., Zimmerman T. J.  
Nickel Influences Iron Metabolism Through Physiologic,  
Pharmacologic and Toxicologic Mechanisms in the Rat.  
J. Nutr. 114 : 1280 - 1288 (1984)
- (74) Nielsen F. H., Shuler T. R., Zimmerman T. J., Collings M. E.  
and Uthus E. C.  
Interaction between Nickel and Iron in the Rat.  
Biol. Tr. El. Res. 1 : 325 - 335 (1979)
- (75) Schäfer S. G., Forth W.  
The Influence of Tin, Nickel and Cadmium on the Intestinal  
Absorption of Iron.  
Ecotox. Env. 7 : 87 - 95 (1983)
- (76) Spears J. W., Harvey R. W., Samsell L. J.  
Effects of Dietary Nickel and Protein on Growth, Nitrogen  
Metabolism and Tissue Concentrations of Nickel, Iron, Zinc  
Manganese and Copper.  
J. Nutr. 116 : 1873 - 1881 (1986)
- (77) Schlick E., Kamran M. A., Friedberg K. D.  
Lead in Blood and Tissues of Mice after Administration of Low  
Lead Doses.  
Arch. Toxicol. 46 : 221 - 232 (1980)

- (78) Tandon S. K., Flora S. J. S., Singh S.  
Chelation in Metal Intoxication, XIV. Comparative Effect of Thiol  
and Amino Chelators on Lead Poisoned Rats with Normal and Damaged  
Kidneys  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 79 : 204 - 210 (1985)
- (79) Oskarsson A., Lind B.  
Increased Lead Levels in Brain after Long-Term Treatment with Lead  
and Dithiocarbamate or Thiuram Derivatives in Rats.  
Acta Pharmacol. Toxicol. 56 : 309 - 315 (1985)
- (80) Barton J. C., Conrad M. E., Holland R.  
Iron, Lead and Cobalt Absorption : Similarities and  
Dissimilarities.  
J. Lab. Clin. Med. 92 (1) : 536 - 547 (1981)
- (81) Ragan H. A.  
Effects of Iron Deficiency on the Absorption and Distribution  
of Lead and Cadmium in Rats.  
J. Lab. Clin. Med. 90 : 700 - 706 (1977)
- (82) Miller G. D., Massaro T. F., Koperek E.  
Low-Level Lead Exposure and the Time-Dependent Organ-Tissue  
Distribution of Essential Elements in the Neonatal Rat.  
Biol. Tr. El. 6 : 519 - 529 (1984)
- (83) Mahaffey K. R.  
Nutrient-Lead Interaktion, in Lead Toxicity (Singhal R. L. und  
Thomas J. A. Eds.), S. 425 - 460  
Urban und Schwarzenberg, Baltimore, München (1980)
- (84) O'Dell L. B.  
Bioavailability of Essential and Toxic Elements  
Fed. Proc. 42 (6) : 1714 - 1716 (1983)
- (85) Morris E. R.  
An Overview of Current Information on Bioavailability of Dietary  
Iron to Humans.  
Fed. Proc. 42 (6) : 1716 - 1720 (1983)
- (86) Spivey Fox M. R.  
Cadmium Bioavailability  
Fed. Proc. 42 (6) : 1726 - 1729 (1983)
- (87) Mahaffey K. R.  
Biotoxicity of Lead : Influence of Various Factors.  
Fed. Proc. 42 (6) : 1730 - 1734 (1983)
- (88) Nordberg G. F., Parizek J., Pershagen G. and Gerhardsson L.  
Factors Influencing Effects and Dose-Response Relationship  
of metals.  
In: Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd ed., Vol I  
(Friberg L., Nordberg G. F. and Vouk V.; Eds)  
pp 143 - 157 (1986)

- (89) Moffat D. B.  
The Mammalian Kidney  
Cambridge University Press (1975)
- (90) Brady F. O., Webb M.  
Metabolism of Zinc and Copper in the Neonate  
J. Lab. Clin. Med. 256 (8) : 3931 - 3935 (1981)
- (91) Sabbioni E., Marafante E.  
Heavy Metals in Rat Liver Cadmium Binding Protein.  
Env. Physiol. Biochem. 5 : 132 - 141 (1975)
- (92) Plotrowski J. K., Szymanska J. A.  
Influence of Certain Metals on the Level of Metallothionein-Like Proteins in the Liver and Kidneys of Rats.  
J. Tox. Env. H. 1 : 991 - 1002 (1976)
- (93) Nolan C. V., Shaikh Z. A.  
Induction of Metallothionein in Rat Tissues Following Subchronic Exposure to Mercury Shown by Radioimmunoassay.  
Biol. Tr. El. Res. 12 : 419 - 428 (1987)
- (94) Danks D. M., Camakaris J., Herd S., Mam J. R. and Phillips M.  
Copper Transport in Menkes' Disease.  
in Biological Aspects of Metals and Metal-Related Diseases  
(ed. B. Sarkar), pp 133 - 145, Raven Press, New York (1983)
- (95) Packman S., O'Toole C., Price D. C., Thaler M. M.  
Cadmium, Zinc and Copper Metabolisms in Mottled Mouse, an Animal Model for Menkes' Knky Hair Syndrome  
J. Inorg. Biochem. 19 : 203 - 211 (1983)
- (96) Funk A. E., Day F. A., Brady F. O.  
Displacement of Zinc and Copper from Copper-Induced Metallothionein by Cadmium and by Mercury: in Vivo and ex Vivo Studies.  
Comp. Biochem. Physiol. 86 C (1) : 1 - 6 (1987)
- (97) Cempel M., Webb M.  
The Time-Course of Cadmium-Thionein Synthesis in the Rat.  
Biochem. Pharmacol. 25 : 2067 - 2071 (1976)
- (98) Tam K. H., Charbonneau S. M., Bryce F., Lacroix G.  
Separation of Arsenic Metabolites in Dog Plasma and Urine Following Intravenous Injection of As<sup>74</sup>.  
Analyt. Biochem. 86 : 505 - 511 (1978)
- (99) Gregus Z., Klaassen C. D.  
Disposition of Metals in Rats : A Comparative Study of Fecal, Urinary and Biliary Excretion and Tissue Distribution of Eighteen Metals.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 85 : 24 - 38 (1986)

- (100) Stonard M. D., Gore C. W., Oliver J. A., Smith I. K.  
Urinary Enzyms and Patterns as Indicators of Injury to Diffrent  
Regions of the Kidney  
Fund. Appl. Toxicol. 9 : 339 - 351, 1987
- (101) Regeln für Maschinenschreiben nach DIN 5008  
Normenausschuß Bürowesen im DIN Deutsches Institut für Normierung  
(1986)



## TABELLENANHANG



Tab.11: Metallkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  P. G.] innerer Organe nach Arsenverfütterung  
M  $\pm$  SEM (n=5); M  $\pm$  SEM (n=11) für Kontrolle

|              | As              | Cd              | Mn | Pb | Cu              | Fe             | Mn              | Zn             |
|--------------|-----------------|-----------------|----|----|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| <b>Leber</b> |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 4,08 $\pm$ 0,22 | 80,7 $\pm$ 2,7 | 2,17 $\pm$ 0,08 | 28,9 $\pm$ 0,5 |
| Basisgr.     | 3,96 $\pm$ 0,32 | 0,25 $\pm$ 0,04 | -  | -  | 4,46 $\pm$ 0,41 | 88,6 $\pm$ 7,7 | 2,46 $\pm$ 0,20 | 29,0 $\pm$ 1,4 |
| As- I        | 9,88 $\pm$ 1,42 | 0,26 $\pm$ 0,02 | -  | -  | 4,38 $\pm$ 0,18 | 76,0 $\pm$ 4,2 | 2,11 $\pm$ 0,10 | 27,1 $\pm$ 1,1 |
| As- II       | 14,3 $\pm$ 0,7  | 0,27 $\pm$ 0,03 | -  | -  | 4,05 $\pm$ 0,08 | 65,0 $\pm$ 3,7 | 2,24 $\pm$ 0,07 | 26,2 $\pm$ 0,8 |
| As- III      | 16,8 $\pm$ 0,8  | 0,24 $\pm$ 0,03 | -  | -  | 3,53 $\pm$ 0,38 | 72,8 $\pm$ 4,6 | 2,23 $\pm$ 0,05 | 27,0 $\pm$ 0,8 |
| As- IV       | 22,8 $\pm$ 1,0  | 0,25 $\pm$ 0,03 | -  | -  | 3,23 $\pm$ 0,17 | 62,2 $\pm$ 2,6 | 2,08 $\pm$ 0,06 | 26,3 $\pm$ 0,7 |
| <b>Niere</b> |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 5,18 $\pm$ 0,26 | 51,2 $\pm$ 2,0 | 1,05 $\pm$ 0,03 | 24,9 $\pm$ 0,3 |
| Basisgr.     | 3,33 $\pm$ 0,43 | 0,86 $\pm$ 0,04 | -  | -  | 7,78 $\pm$ 1,24 | 44,9 $\pm$ 3,2 | 0,99 $\pm$ 0,02 | 23,4 $\pm$ 0,6 |
| As- I        | 8,63 $\pm$ 1,37 | 0,76 $\pm$ 0,04 | -  | -  | 9,77 $\pm$ 0,86 | 45,7 $\pm$ 4,5 | 0,92 $\pm$ 0,05 | 22,9 $\pm$ 0,5 |
| As- II       | 19,0 $\pm$ 2,8  | 0,83 $\pm$ 0,05 | -  | -  | 19,6 $\pm$ 4,2  | 44,2 $\pm$ 2,2 | 0,96 $\pm$ 0,01 | 23,6 $\pm$ 0,8 |
| As- III      | 39,9 $\pm$ 8,2  | 0,52 $\pm$ 0,05 | -  | -  | 46,1 $\pm$ 11,6 | 42,4 $\pm$ 2,0 | 0,92 $\pm$ 0,02 | 23,3 $\pm$ 0,5 |
| As- IV       | 71,6 $\pm$ 9,2  | 0,70 $\pm$ 0,05 | -  | -  | 81,4 $\pm$ 11,5 | 44,2 $\pm$ 3,8 | 0,93 $\pm$ 0,03 | 24,1 $\pm$ 0,6 |
| <b>Darm</b>  |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 1,26 $\pm$ 0,08 | 23,8 $\pm$ 1,7 | 0,97 $\pm$ 0,10 | 31,7 $\pm$ 0,9 |
| Basisgr.     | -               | 1,30 $\pm$ 0,41 | -  | -  | 1,73 $\pm$ 0,17 | 27,1 $\pm$ 2,1 | 0,82 $\pm$ 0,10 | 28,5 $\pm$ 0,8 |
| As- I        | 2,67 $\pm$ 0,44 | 1,28 $\pm$ 0,42 | -  | -  | 1,26 $\pm$ 0,09 | 27,1 $\pm$ 1,9 | 0,81 $\pm$ 0,10 | 30,5 $\pm$ 1,6 |
| As- II       | 4,04 $\pm$ 0,15 | 3,01 $\pm$ 0,64 | -  | -  | 1,37 $\pm$ 0,04 | 29,0 $\pm$ 1,8 | 0,88 $\pm$ 0,09 | 28,5 $\pm$ 1,6 |
| As- III      | 5,58 $\pm$ 0,41 | 1,13 $\pm$ 0,06 | -  | -  | 1,32 $\pm$ 0,22 | 25,4 $\pm$ 2,8 | 0,61 $\pm$ 0,07 | 29,7 $\pm$ 1,2 |
| As- IV       | 8,05 $\pm$ 0,05 | 1,27 $\pm$ 0,27 | -  | -  | 1,35 $\pm$ 0,14 | 20,4 $\pm$ 1,3 | 0,46 $\pm$ 0,03 | 27,4 $\pm$ 1,5 |

Tab.12: Metallkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  P. G. bzw  $\mu\text{g/ml}$ ] in Plasma und Blutzellen nach Arsenverfütterung  
M  $\pm$  SEM (n=5); M  $\pm$  SEM (n=11) bei Kontrollen, mit Ausnahme des Kupferwertes für die Blutzellen

|                   | As              | Cd | Ni | Pb | Cu              | Fe              | Mn | Zn              |
|-------------------|-----------------|----|----|----|-----------------|-----------------|----|-----------------|
| <b>Plasma</b>     |                 |    |    |    |                 |                 |    |                 |
| Kontrollen        | -               | -  | -  | -  | 0,73 $\pm$ 0,06 | 1,98 $\pm$ 0,13 | -  | 1,20 $\pm$ 0,04 |
| Basigr.           | -               | -  | -  | -  | 0,72 $\pm$ 0,04 | 1,91 $\pm$ 0,20 | -  | 1,02 $\pm$ 0,16 |
| AS- I             | -               | -  | -  | -  | 0,84 $\pm$ 0,01 | 2,11 $\pm$ 0,16 | -  | 0,83 $\pm$ 0,03 |
| AS- II            | -               | -  | -  | -  | 0,82 $\pm$ 0,03 | 1,68 $\pm$ 0,15 | -  | 0,88 $\pm$ 0,07 |
| AS- III           | -               | -  | -  | -  | 0,67 $\pm$ 0,06 | 1,89 $\pm$ 0,11 | -  | 0,82 $\pm$ 0,06 |
| AS- IV            | -               | -  | -  | -  | 0,53 $\pm$ 0,10 | 1,10 $\pm$ 0,09 | -  | 0,83 $\pm$ 0,09 |
| <b>Blutzellen</b> |                 |    |    |    |                 |                 |    |                 |
| Kontrollen        | 2,19 $\pm$ 0,25 | -  | -  | -  | 0,78 $\pm$ 0,06 | 832 $\pm$ 16    | -  | 8,33 $\pm$ 0,41 |
| Basigr.           | 167 $\pm$ 6     | -  | -  | -  | 0,60 $\pm$ 0,04 | 875 $\pm$ 24    | -  | 7,47 $\pm$ 0,30 |
| AS- I             | 393 $\pm$ 16    | -  | -  | -  | 0,55 $\pm$ 0,01 | 877 $\pm$ 14    | -  | 7,28 $\pm$ 0,23 |
| AS- II            | 557 $\pm$ 27    | -  | -  | -  | 0,60 $\pm$ 0,03 | 866 $\pm$ 28    | -  | 7,24 $\pm$ 0,19 |
| AS- III           | 595 $\pm$ 18    | -  | -  | -  | 0,44 $\pm$ 0,05 | 842 $\pm$ 18    | -  | 7,94 $\pm$ 0,38 |
| AS- IV            | 579 $\pm$ 22    | -  | -  | -  | 0,42 $\pm$ 0,03 | 809 $\pm$ 51    | -  | 8,24 $\pm$ 0,32 |

Tab.13: Arsenkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G.] in Geweben nach Arsenverfütterung  
M  $\pm$  SEM (n=5)

|           | Gehirn          | Knochen         | Muskel          | Haare          |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Kontrolle | -               | -               | -               | -              |
| Basigr.   | -               | -               | -               | -              |
| AS- I     | -               | 3,26 $\pm$ 0,52 | 1,42 $\pm$ 0,14 | -              |
| AS- II    | 2,44 $\pm$ 0,21 | 9,87 $\pm$ 0,09 | 2,22 $\pm$ 0,16 | -              |
| AS- III   | 3,87 $\pm$ 0,18 | 16,0 $\pm$ 1,2  | 4,54 $\pm$ 0,23 | 8,90 $\pm$ 1,6 |
| AS- IV    | 4,37 $\pm$ 0,37 | 14,3 $\pm$ 0,8  | 5,65 $\pm$ 0,38 | 16,2 $\pm$ 2,6 |

Tab. 14: Metallkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  P. G.] innerer Organe nach Cadmiumverfütterung  
 $M \pm \text{SEM}$  (n=5);  $M \pm \text{SEM}$  (n=11) bei Kontrollen

|              | As              | Cd              | Ni | Pb | Cu              | Fe             | Mn              | Zn             |
|--------------|-----------------|-----------------|----|----|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| <b>Leber</b> |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 4,08 $\pm$ 0,22 | 80,7 $\pm$ 2,7 | 2,17 $\pm$ 0,08 | 28,9 $\pm$ 0,5 |
| Basisgr.     | 4,34 $\pm$ 0,33 | 0,34 $\pm$ 0,05 | -  | -  | 4,55 $\pm$ 0,28 | 83,9 $\pm$ 9,8 | 2,08 $\pm$ 0,09 | 26,8 $\pm$ 1,6 |
| Cd- I        | 4,08 $\pm$ 0,53 | 0,88 $\pm$ 0,08 | -  | -  | 4,17 $\pm$ 0,08 | 59,8 $\pm$ 8,4 | 2,11 $\pm$ 0,05 | 27,3 $\pm$ 0,6 |
| Cd- II       | 4,60 $\pm$ 0,26 | 1,75 $\pm$ 0,10 | -  | -  | 4,21 $\pm$ 0,05 | 53,9 $\pm$ 4,6 | 2,21 $\pm$ 0,05 | 28,1 $\pm$ 1,3 |
| Cd- III      | 5,12 $\pm$ 0,28 | 4,93 $\pm$ 0,29 | -  | -  | 4,44 $\pm$ 0,09 | 39,0 $\pm$ 2,0 | 2,38 $\pm$ 0,08 | 30,2 $\pm$ 0,8 |
| Cd- IV       | 4,28 $\pm$ 0,30 | 9,61 $\pm$ 0,83 | -  | -  | 4,14 $\pm$ 0,36 | 32,4 $\pm$ 1,3 | 2,49 $\pm$ 0,06 | 32,6 $\pm$ 1,7 |
| <b>Niere</b> |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 5,18 $\pm$ 0,26 | 51,2 $\pm$ 2,0 | 1,05 $\pm$ 0,03 | 24,9 $\pm$ 0,3 |
| Basisgr.     | 4,20 $\pm$ 0,51 | 1,16 $\pm$ 0,08 | -  | -  | 9,85 $\pm$ 2,98 | 50,0 $\pm$ 2,6 | 1,07 $\pm$ 0,05 | 24,1 $\pm$ 0,2 |
| Cd- I        | 4,81 $\pm$ 0,75 | 2,14 $\pm$ 0,21 | -  | -  | 9,00 $\pm$ 0,30 | 47,5 $\pm$ 3,4 | 0,94 $\pm$ 0,04 | 25,3 $\pm$ 1,1 |
| Cd- II       | 4,74 $\pm$ 0,86 | 4,14 $\pm$ 0,37 | -  | -  | 9,26 $\pm$ 0,56 | 43,8 $\pm$ 3,6 | 0,88 $\pm$ 0,04 | 24,6 $\pm$ 0,5 |
| Cd- III      | 4,97 $\pm$ 0,48 | 8,00 $\pm$ 0,62 | -  | -  | 8,59 $\pm$ 0,46 | 41,3 $\pm$ 2,3 | 1,05 $\pm$ 0,02 | 23,1 $\pm$ 0,3 |
| Cd- IV       | 4,43 $\pm$ 0,25 | 12,8 $\pm$ 0,8  | -  | -  | 8,69 $\pm$ 0,97 | 33,2 $\pm$ 2,1 | 0,99 $\pm$ 0,04 | 24,6 $\pm$ 0,5 |
| <b>Darm</b>  |                 |                 |    |    |                 |                |                 |                |
| Kontrolle    | -               | -               | -  | -  | 1,26 $\pm$ 0,08 | 23,8 $\pm$ 1,7 | 0,97 $\pm$ 0,10 | 31,7 $\pm$ 0,9 |
| Basisgr.     | -               | 1,52 $\pm$ 0,09 | -  | -  | 1,39 $\pm$ 0,03 | 22,0 $\pm$ 1,8 | 0,68 $\pm$ 0,12 | 29,4 $\pm$ 1,3 |
| Cd- I        | -               | 6,68 $\pm$ 0,91 | -  | -  | 1,65 $\pm$ 0,14 | 19,4 $\pm$ 1,0 | 0,67 $\pm$ 0,04 | 30,7 $\pm$ 1,9 |
| Cd- II       | -               | 6,47 $\pm$ 1,46 | -  | -  | 1,63 $\pm$ 0,23 | 15,1 $\pm$ 0,7 | 0,50 $\pm$ 0,10 | 27,8 $\pm$ 1,7 |
| Cd- III      | -               | 8,91 $\pm$ 1,07 | -  | -  | 2,10 $\pm$ 0,17 | 13,2 $\pm$ 0,5 | 0,55 $\pm$ 0,05 | 28,7 $\pm$ 1,3 |
| Cd- IV       | -               | 11,6 $\pm$ 0,9  | -  | -  | 1,57 $\pm$ 0,14 | 11,2 $\pm$ 1,0 | 0,46 $\pm$ 0,07 | 26,0 $\pm$ 1,6 |

Tab.15: Metallkonzentrationen [ $\mu\text{g/g P. G.}$ ] von Knochen, Haut, Blutzellen nach Cadmiumverfütterung  
 $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5);  $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=11) bei Kontrollen

|                   | As              | Cd              | Ni | Pb | Cu              | Fe              | Mn              | Zn              |
|-------------------|-----------------|-----------------|----|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Knochen</b>    |                 |                 |    |    |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle         | -               | -               | -  | -  | 0,74 $\pm$ 0,05 | 37,6 $\pm$ 2,0  | 0,38 $\pm$ 0,02 | 114 $\pm$ 3     |
| Basisgr.          | -               | -               | -  | -  | 0,88 $\pm$ 0,11 | 33,8 $\pm$ 1,6  | 0,31 $\pm$ 0,03 | 98,3 $\pm$ 2,0  |
| Cd- I             | -               | -               | -  | -  | 0,73 $\pm$ 0,01 | 31,4 $\pm$ 2,2  | 0,33 $\pm$ 0,02 | 106 $\pm$ 4     |
| Cd- II            | -               | -               | -  | -  | 0,85 $\pm$ 0,03 | 28,5 $\pm$ 2,2  | 0,32 $\pm$ 0,04 | 101 $\pm$ 5     |
| Cd- III           | -               | -               | -  | -  | 0,83 $\pm$ 0,04 | 25,8 $\pm$ 0,9  | 0,29 $\pm$ 0,03 | 85,8 $\pm$ 1,9  |
| Cd- IV            | -               | -               | -  | -  | 0,71 $\pm$ 0,07 | 20,1 $\pm$ 2,2  | 0,27 $\pm$ 0,01 | 71,6 $\pm$ 1,7  |
| <b>Haut</b>       |                 |                 |    |    |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle         | -               | -               | -  | -  | 0,61 $\pm$ 0,04 | 7,89 $\pm$ 0,43 | -               | 13,0 $\pm$ 1,5  |
| Basisgr.          | -               | -               | -  | -  | 0,64 $\pm$ 0,06 | 8,73 $\pm$ 0,60 | -               | 13,4 $\pm$ 2,5  |
| Cd- I             | -               | -               | -  | -  | 0,73 $\pm$ 0,09 | 7,08 $\pm$ 0,54 | -               | 13,5 $\pm$ 2,2  |
| Cd- II            | -               | -               | -  | -  | 0,65 $\pm$ 0,06 | 6,61 $\pm$ 0,59 | -               | 10,1 $\pm$ 0,6  |
| Cd- III           | -               | -               | -  | -  | 0,59 $\pm$ 0,04 | 4,60 $\pm$ 0,48 | -               | 14,1 $\pm$ 1,6  |
| Cd- IV            | -               | -               | -  | -  | 0,61 $\pm$ 0,05 | 4,09 $\pm$ 0,44 | -               | 11,8 $\pm$ 1,3  |
| <b>Blutzellen</b> |                 |                 |    |    |                 |                 |                 |                 |
| Kontrolle         | 2,19 $\pm$ 0,25 | -               | -  | -  | 0,32 $\pm$ 0,02 | 832 $\pm$ 16    | -               | 8,33 $\pm$ 0,37 |
| Basisgr.          | 192 $\pm$ 10    | 0,39 $\pm$ 0,04 | -  | -  | 0,30 $\pm$ 0,03 | 846 $\pm$ 23    | -               | 8,28 $\pm$ 0,08 |
| Cd- I             | 179 $\pm$ 6     | 0,44 $\pm$ 0,03 | -  | -  | 0,39 $\pm$ 0,03 | 780 $\pm$ 14    | -               | 7,54 $\pm$ 0,42 |
| Cd- II            | 182 $\pm$ 8     | 0,49 $\pm$ 0,03 | -  | -  | 0,28 $\pm$ 0,02 | 770 $\pm$ 17    | -               | 7,85 $\pm$ 0,23 |
| Cd- III           | 213 $\pm$ 9     | 0,68 $\pm$ 0,04 | -  | -  | 0,36 $\pm$ 0,02 | 836 $\pm$ 14    | -               | 7,22 $\pm$ 0,43 |
| Cd- IV            | 211 $\pm$ 15    | 0,75 $\pm$ 0,06 | -  | -  | 0,32 $\pm$ 0,04 | 794 $\pm$ 30    | -               | 7,74 $\pm$ 0,71 |

Tab. 16: Metallkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G.] innerer Organe nach Nickelverfütterung

$\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5);  $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=11) bei Kontrollen

\* = mit AAS gemessen

|              | As              | Cd              | Ni               | Pb               | Cu              | Fe             | Mn              | Zn             |
|--------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| <b>Leber</b> |                 |                 |                  |                  |                 |                |                 |                |
| Kontrollen   | -               | -               | -                | -                | 4,08 $\pm$ 0,22 | 80,7 $\pm$ 2,7 | 2,17 $\pm$ 0,08 | 28,9 $\pm$ 0,5 |
| Basisgr.     | 4,81 $\pm$ 0,23 | 0,32 $\pm$ 0,01 | -                | -                | 4,28 $\pm$ 0,15 | 82,1 $\pm$ 7,6 | 2,10 $\pm$ 0,09 | 27,6 $\pm$ 1,1 |
| Ni- I        | 4,36 $\pm$ 0,33 | 0,33 $\pm$ 0,03 | -                | -                | 4,62 $\pm$ 0,15 | 80,3 $\pm$ 3,6 | 2,32 $\pm$ 0,10 | 30,3 $\pm$ 0,9 |
| Ni- II       | 5,59 $\pm$ 0,33 | 0,46 $\pm$ 0,02 | -                | -                | 4,44 $\pm$ 0,29 | 71,4 $\pm$ 6,6 | 2,42 $\pm$ 0,13 | 29,6 $\pm$ 1,7 |
| Ni- III      | 4,41 $\pm$ 0,24 | 0,35 $\pm$ 0,02 | -                | -                | 4,47 $\pm$ 0,19 | 75,1 $\pm$ 6,2 | 2,06 $\pm$ 0,09 | 26,9 $\pm$ 1,2 |
| Ni- IV       | 4,63 $\pm$ 0,23 | 0,35 $\pm$ 0,02 | -                | -                | 4,42 $\pm$ 0,29 | 77,7 $\pm$ 4,7 | 2,04 $\pm$ 0,10 | 28,9 $\pm$ 1,6 |
| <b>Niere</b> |                 |                 |                  |                  |                 |                |                 |                |
| Kontrollen   | -               | -               | -                | -                | 5,18 $\pm$ 0,26 | 51,2 $\pm$ 2,0 | 1,05 $\pm$ 0,03 | 24,9 $\pm$ 0,3 |
| Basisgr.     | 5,71 $\pm$ 0,51 | 1,18 $\pm$ 0,08 | -                | -                | 8,63 $\pm$ 0,48 | 57,2 $\pm$ 3,6 | 1,10 $\pm$ 0,03 | 25,4 $\pm$ 0,3 |
| Ni- I        | 4,74 $\pm$ 0,99 | 1,05 $\pm$ 0,07 | 0,64 $\pm$ 0,06  | 0,85 $\pm$ 0,08* | 7,81 $\pm$ 0,43 | 44,3 $\pm$ 4,2 | 1,09 $\pm$ 0,02 | 26,2 $\pm$ 0,4 |
| Ni- II       | 5,43 $\pm$ 1,11 | 1,62 $\pm$ 0,09 | 1,71 $\pm$ 0,03  | 0,92 $\pm$ 0,10* | 7,17 $\pm$ 0,53 | 52,2 $\pm$ 7,0 | 1,12 $\pm$ 0,04 | 24,5 $\pm$ 0,4 |
| Ni- III      | 5,09 $\pm$ 0,29 | 1,29 $\pm$ 0,09 | 2,78 $\pm$ 0,16  | 1,16 $\pm$ 0,11* | 6,99 $\pm$ 0,27 | 52,5 $\pm$ 4,2 | 1,01 $\pm$ 0,03 | 25,2 $\pm$ 0,6 |
| Ni- IV       | 5,78 $\pm$ 0,67 | 1,28 $\pm$ 0,07 | 5,71 $\pm$ 0,33  | 1,08 $\pm$ 0,13* | 6,63 $\pm$ 0,44 | 59,4 $\pm$ 3,7 | 0,99 $\pm$ 0,03 | 24,8 $\pm$ 0,4 |
| <b>Darm</b>  |                 |                 |                  |                  |                 |                |                 |                |
| Kontrollen   | -               | -               | -                | -                | 1,26 $\pm$ 0,08 | 23,8 $\pm$ 1,7 | 0,97 $\pm$ 0,10 | 31,7 $\pm$ 0,9 |
| Basisgr.     | -               | 1,85 $\pm$ 0,38 | -                | -                | 1,65 $\pm$ 0,09 | 21,9 $\pm$ 1,1 | 0,96 $\pm$ 0,10 | 32,0 $\pm$ 1,6 |
| Ni- I        | -               | 1,95 $\pm$ 0,38 | 0,37 $\pm$ 0,04* | -                | 1,81 $\pm$ 0,23 | 20,7 $\pm$ 0,9 | 0,82 $\pm$ 0,09 | 29,7 $\pm$ 1,7 |
| Ni- II       | -               | 1,81 $\pm$ 0,25 | 0,54 $\pm$ 0,07* | -                | 1,86 $\pm$ 0,29 | 24,4 $\pm$ 1,3 | 0,84 $\pm$ 0,07 | 27,1 $\pm$ 1,9 |
| Ni- III      | -               | 3,22 $\pm$ 0,31 | 2,19 $\pm$ 0,28  | -                | 2,28 $\pm$ 0,12 | 21,2 $\pm$ 1,2 | 1,12 $\pm$ 0,12 | 32,3 $\pm$ 1,2 |
| Ni- IV       | -               | 2,29 $\pm$ 0,39 | 6,04 $\pm$ 0,83  | -                | 2,79 $\pm$ 0,20 | 24,8 $\pm$ 1,2 | 1,10 $\pm$ 0,07 | 27,4 $\pm$ 0,7 |

Tab.17: Metallkonzentrationen von Niere und Knochen [ $\mu\text{g/g}$  F. G.] nach Bleiverfütterung  
 $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5);  $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=11) bei Kontrollen

|                | As              | Cd              | Ni | Pb               | Cu              | Fe             | Mn              | Zn             |
|----------------|-----------------|-----------------|----|------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| <b>Niere</b>   |                 |                 |    |                  |                 |                |                 |                |
| Kontrollen     | -               | -               | -  | -                | 5,18 $\pm$ 0,26 | 51,2 $\pm$ 2,0 | 1,05 $\pm$ 0,03 | 24,9 $\pm$ 0,3 |
| Basisgr.       | 4,58 $\pm$ 0,20 | 0,91 $\pm$ 0,11 | -  | -                | 8,53 $\pm$ 0,72 | 57,9 $\pm$ 0,4 | 1,04 $\pm$ 0,04 | 24,3 $\pm$ 0,6 |
| Pb- I          | 4,12 $\pm$ 0,04 | 0,93 $\pm$ 0,03 | -  | -                | 8,34 $\pm$ 0,79 | 49,8 $\pm$ 1,0 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 25,3 $\pm$ 1,2 |
| Pb- II         | 4,88 $\pm$ 0,51 | 0,85 $\pm$ 0,07 | -  | 1,55 $\pm$ 0,12* | 8,48 $\pm$ 0,25 | 56,9 $\pm$ 3,6 | 0,95 $\pm$ 0,02 | 25,5 $\pm$ 0,3 |
| Pb- III        | 4,05 $\pm$ 0,11 | 0,87 $\pm$ 0,07 | -  | 2,60 $\pm$ 0,16  | 9,51 $\pm$ 0,71 | 49,8 $\pm$ 2,8 | 1,01 $\pm$ 0,01 | 25,6 $\pm$ 0,3 |
| Pb- IV         | 4,58 $\pm$ 0,67 | 0,91 $\pm$ 0,06 | -  | 4,75 $\pm$ 0,44  | 8,11 $\pm$ 0,43 | 54,1 $\pm$ 4,4 | 1,02 $\pm$ 0,06 | 25,0 $\pm$ 0,8 |
| <b>Knochen</b> |                 |                 |    |                  |                 |                |                 |                |
| Kontrollen     | -               | -               | -  | -                | 0,74 $\pm$ 0,05 | 37,6 $\pm$ 2,0 | 0,38 $\pm$ 0,02 | 114 $\pm$ 2    |
| Basisgr.       | 2,18 $\pm$ 0,27 | -               | -  | -                | 0,84 $\pm$ 0,05 | 45,1 $\pm$ 3,7 | 0,43 $\pm$ 0,04 | 109 $\pm$ 5    |
| Pb- I          | 1,83 $\pm$ 0,21 | -               | -  | 3,07 $\pm$ 0,23  | 0,76 $\pm$ 0,08 | 39,4 $\pm$ 3,4 | 0,36 $\pm$ 0,02 | 92,5 $\pm$ 2   |
| Pb- II         | 1,70 $\pm$ 0,12 | -               | -  | 6,63 $\pm$ 0,61  | 0,82 $\pm$ 0,06 | 44,7 $\pm$ 2,2 | 0,40 $\pm$ 0,01 | 111 $\pm$ 2    |
| Pb- III        | 1,40 $\pm$ 0,18 | -               | -  | 11,2 $\pm$ 1,2   | 0,86 $\pm$ 0,06 | 40,4 $\pm$ 3,2 | 0,43 $\pm$ 0,04 | 107 $\pm$ 5    |
| Pb- IV         | 1,34 $\pm$ 0,06 | -               | -  | 21,3 $\pm$ 3,3   | 0,86 $\pm$ 0,02 | 36,2 $\pm$ 1,3 | 0,39 $\pm$ 0,02 | 96,2 $\pm$ 3   |

Tab.18: Bleikonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G.] im Darm und in den Haaren nach Bleiverfütterung  
 $\bar{M} \pm \text{SEM}$  (n=5), \* = mit AAS gemessen

|            | Darm             | Haare           |
|------------|------------------|-----------------|
| Kontrollen | -                | -               |
| Basisgr.   | 0,28 $\pm$ 0,07* | < 0,45*         |
| Pb- I      | 0,38 $\pm$ 0,06* | 4,03 $\pm$ 0,62 |
| Pb- II     | 0,50 $\pm$ 0,12* | 3,98 $\pm$ 0,64 |
| Pb- III    | 0,45 $\pm$ 0,08* | 4,96 $\pm$ 1,09 |
| Pb- IV     | 1,01 $\pm$ 0,26* | 4,39 $\pm$ 0,90 |

Tab.19: Kupferkonzentrationen und Arsenkonzentration in den Blutzellen der Kontrollen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] zum Zeitpunkt 0  $M \pm \text{SEM}$  (n=4), bei Homogenaten M (n=2)

|           |           | Cu              | AS              |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------|
| Niere     | Rinde     | $10,5 \pm 1,1$  | -               |
|           | Mark      | $2,82 \pm 0,1$  | -               |
| Leber     |           | $4,19 \pm 0,14$ | -               |
| Mukosa    |           | $1,76 \pm 0,09$ | -               |
| Blut      | Plasma    | $1,16 \pm 0,02$ | $2,05 \pm 0,06$ |
|           | Zellen    | $0,64 \pm 0,08$ |                 |
| Homogenat | Pellet    | 7,28            | -               |
|           | Überstand | 2,23            | -               |

Tab.20: Arsenkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 1. Woche des Zeitversuchs

$M \pm \text{SEM}$  (n=4), \* = mit AAS gemessen

| 1. Woche |        | Kontrolle      | Basisgr.         | As-I            | As-II           |
|----------|--------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | -              | 1,18 $\pm$ 0,07* | 1,63 $\pm$ 0,06 | 4,73 $\pm$ 1,10 |
|          | Mark   | -              | 0,62 $\pm$ 0,13* | 2,89 $\pm$ 0,22 | 4,08 $\pm$ 1,18 |
| Leber    |        | -              | -                | 1,40 $\pm$ 0,06 | 1,12 $\pm$ 0,11 |
| Mukosa   |        | -              | -                | -               | 1,53 $\pm$ 0,39 |
| Blut     | Plasma | -              | -                | -               | 0,71 $\pm$ 0,18 |
|          | Zellen | 1,89 $\pm$ 0,7 | 95,2 $\pm$ 3,1   | 207 $\pm$ 26    | 413 $\pm$ 24    |

Tab.21: Kupferkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 1. Woche des Zeitversuchs

$M \pm \text{SEM}$  (n=4)

| 1. Woche |        | Kontrolle       | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|----------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | 10,3 $\pm$ 1,2  | 9,33 $\pm$ 0,82 | 10,7 $\pm$ 0,8  | 14,2 $\pm$ 3,1  |
|          | Mark   | 2,56 $\pm$ 0,14 | 2,77 $\pm$ 0,11 | 2,46 $\pm$ 0,11 | 2,93 $\pm$ 0,18 |
| Leber    |        | 4,76 $\pm$ 0,10 | 4,11 $\pm$ 0,18 | 4,19 $\pm$ 0,18 | 4,56 $\pm$ 0,24 |
| Mukosa   |        | 2,24 $\pm$ 0,13 | 2,17 $\pm$ 0,10 | 2,60 $\pm$ 0,14 | 2,20 $\pm$ 0,18 |
| Blut     | Plasma | 1,43 $\pm$ 0,15 | 1,16 $\pm$ 0,05 | 1,28 $\pm$ 0,02 | 1,69 $\pm$ 0,17 |
|          | Zellen | 0,81 $\pm$ 0,09 | 0,72 $\pm$ 0,10 | 0,67 $\pm$ 0,02 | 0,74 $\pm$ 0,08 |

Tab.22: Cadmiumkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 1. Woche des Zeitversuchs

$M \pm \text{SEM}$  (n=4), + = Einzelwert

| 1. Woche |        | Kontrolle | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|----------|--------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | -         | 0,24+           | 0,26+           | 0,20 $\pm$ 0,01 |
|          | Mark   | -         | -               | -               | -               |
| Leber    |        | -         | -               | 0,24 $\pm$ 0,02 | 0,20+           |
| Mukosa   |        | -         | 16,4 $\pm$ 2,1  | 17,0 $\pm$ 2,2  | 17,0 $\pm$ 1,8  |
| Blut     | Plasma | -         | -               | -               | -               |
|          | Zellen | -         | 0,15 $\pm$ 0,02 | 0,42 $\pm$ 0,08 | 0,73 $\pm$ 0,1  |

Tab.23: Arsenkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 3. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4); bei Homogenaten M (n=2)

\* = Bestimmung mit AAS, n.g. = nicht gemessen

| 3. Woche  |           | Kontrolle       | Basisgr.         | As-I             | As-II             |
|-----------|-----------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Niere     | Rinde     | -               | 0,60 $\pm$ 0,13* | 1,27 $\pm$ 0,13* | 8,72 $\pm$ 2,3    |
|           | Mark      | -               | 1,47 $\pm$ 0,08* | 2,65 $\pm$ 0,18  | 6,23 $\pm$ 1,3    |
| Leber     |           | -               | -                | 4,62 $\pm$ 0,74  | 6,53 $\pm$ 0,6    |
| Mukosa    |           | -               | -                | -                | 3,29 $\pm$ 0,17   |
| Blut      | Plasma    | -               | -                | 0,40 $\pm$ 0,05* | * 0,60 $\pm$ 0,05 |
|           | Zellen    | 2,11 $\pm$ 0,12 | 234 $\pm$ 7      | 445 $\pm$ 15     | 537 $\pm$ 19      |
| Homogenat | Pellet    | -               | 0,46*            | n.g.             | 4,34              |
|           | Überstand | -               | 0,19*            | n.g.             | 0,73*             |

Tab.24: Kupferkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 3. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4); bei Homogenaten M (n=2)

n.g. = nicht gemessen

| 3. Woche  |           | Kontrolle       | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere     | Rinde     | 13,6 $\pm$ 1,3  | 13,1 $\pm$ 1,6  | 14,3 $\pm$ 0,6  | 24,2 $\pm$ 2,3  |
|           | Mark      | 2,92 $\pm$ 0,11 | 3,05 $\pm$ 0,23 | 2,82 $\pm$ 0,20 | 3,28 $\pm$ 0,22 |
| Leber     |           | 5,13 $\pm$ 0,11 | 4,84 $\pm$ 0,19 | 4,61 $\pm$ 0,26 | 4,96 $\pm$ 0,29 |
| Mukosa    |           | 1,93 $\pm$ 0,06 | 2,35 $\pm$ 0,12 | 2,37 $\pm$ 0,14 | 2,44 $\pm$ 0,13 |
| Blut      | Plasma    | 1,42 $\pm$ 0,16 | 1,11 $\pm$ 0,07 | 1,21 $\pm$ 0,13 | 1,21 $\pm$ 0,09 |
|           | Zellen    | 0,76 $\pm$ 0,07 | 0,99 $\pm$ 0,03 | 0,85 $\pm$ 0,09 | 0,84 $\pm$ 0,04 |
| Homogenat | Pellet    | 8,90            | 6,32            | n.g.            | 14,4            |
|           | Überstand | 4,33            | 3,31            | n.g.            | 4,06            |

Tab.25: Cadmiumkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  P. G. bzw  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der  
3. Woche des Zeitversuchs

$M \pm \text{SEM}$  (n=4); bei Homogenaten M (n=2)

n.g. = nicht gemessen, \* = Bestimmung mit AAS

| 3. Woche  |           | Kontrolle | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere     | Rinde     | -         | $1,13 \pm 0,25$ | $1,45 \pm 0,07$ | $1,07 \pm 0,16$ |
|           | Mark      | -         | -               | -               | -               |
| Leber     |           | -         | $0,24 \pm 0,07$ | $0,39 \pm 0,04$ | $0,40 \pm 0,06$ |
| Mukosa    |           | -         | $13,9 \pm 1,2$  | $14,6 \pm 1,8$  | $16,2 \pm 2,5$  |
| Blut      | Plasma    | -         | -               | -               | -               |
|           | Zellen    | -         | $0,33 \pm 0,02$ | $0,78 \pm 0,08$ | $0,83 \pm 0,14$ |
| Pelet     |           | -         | $0,31^*$        | n.g.            | $0,32^*$        |
| Homogenat | Überstand | -         | $0,18^*$        | n.g.            | $0,22^*$        |

Tab.26: Arsenkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 7. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4), + = Einzelwert

\* = Bestimmung mit AAS

| 7. Woche |        | Kontrollen      | Basisgr.         | As-I            | As-II           |
|----------|--------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | -               | 0,79 $\pm$ 0,14* | 5,39 $\pm$ 1,19 | 5,40 $\pm$ 0,93 |
|          | Mark   | -               | 2,24 $\pm$ 0,27  | 4,35 $\pm$ 0,46 | 5,20 $\pm$ 0,48 |
| Leber    |        | -               | 2,91+            | 4,32 $\pm$ 0,45 | 4,84 $\pm$ 0,75 |
| Mukosa   |        | -               | -                | 1,31+           | 2,98 $\pm$ 0,48 |
| Blut     | Plasma | -               | 0,78 $\pm$ 0,12  | 0,67 $\pm$ 0,21 | 0,81 $\pm$ 0,33 |
|          | Zellen | 2,36 $\pm$ 0,30 | 458 $\pm$ 46     | 513 $\pm$ 33    | 564 $\pm$ 5     |

Tab.27: Kupferkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 7. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4)

| 7. Woche |        | Kontrollen      | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|----------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | 15,1 $\pm$ 1,0  | 22,4 $\pm$ 4,4  | 23,6 $\pm$ 2,8  | 22,1 $\pm$ 2,9  |
|          | Mark   | 2,81 $\pm$ 0,16 | 2,70 $\pm$ 0,20 | 2,97 $\pm$ 0,09 | 3,01 $\pm$ 0,17 |
| Leber    |        | 5,02 $\pm$ 0,11 | 4,72 $\pm$ 0,28 | 4,93 $\pm$ 0,16 | 4,72 $\pm$ 0,11 |
| Mukosa   |        | 1,52 $\pm$ 0,10 | 2,00 $\pm$ 0,14 | 1,80 $\pm$ 0,05 | 1,93 $\pm$ 0,07 |
| Blut     | Plasma | 1,24 $\pm$ 0,07 | 1,51 $\pm$ 0,18 | 1,01 $\pm$ 0,07 | 1,14 $\pm$ 0,13 |
|          | Zellen | 0,88 $\pm$ 0,06 | 0,88 $\pm$ 0,08 | 1,08 $\pm$ 0,09 | 0,94 $\pm$ 0,05 |

Tab.28: Cadmiumkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 7. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4)

| 7. Woche |        | Kontrollen | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|----------|--------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere    | Rinde  | -          | 2,88 $\pm$ 0,20 | 3,54 $\pm$ 0,30 | 2,78 $\pm$ 0,36 |
|          | Mark   | -          | -               | 0,26 $\pm$ 0,01 | 0,22 $\pm$ 0,02 |
| Leber    |        | -          | 0,74 $\pm$ 0,06 | 1,22 $\pm$ 0,13 | 0,94 $\pm$ 0,57 |
| Mukosa   |        | -          | 13,4 $\pm$ 2,4  | 11,8 $\pm$ 1,0  | 13,6 $\pm$ 1,9  |
| Blut     | Plasma | -          | -               | -               | -               |
|          | Zellen | -          | 0,87 $\pm$ 0,08 | 1,15 $\pm$ 0,02 | 1,15 $\pm$ 0,10 |

Tab.29: Arsenkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der

15. Woche des Zeitversuch

M  $\pm$  SEM (n=4), bei Homogenaten M (n=2)

\* = Bestimmung mit AAS

| 15. Woche |           | Kontrollen      | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere     | Rinde     | -               | 2,22 $\pm$ 0,42 | 4,54 $\pm$ 1,17 | 4,90 $\pm$ 0,63 |
|           | Mark      | -               | 2,68 $\pm$ 0,72 | 3,90 $\pm$ 0,42 | 4,61 $\pm$ 0,76 |
| Leber     |           | -               | 2,53 $\pm$ 0,37 | 5,28 $\pm$ 0,32 | 5,26 $\pm$ 1,16 |
| Mukosa    |           | -               | -               | 1,79 $\pm$ 0,19 | 2,12 $\pm$ 0,13 |
| Blut      | Plasma    | -               | 0,63 $\pm$ 0,04 | 0,50 $\pm$ 0,03 | 0,66 $\pm$ 0,03 |
|           | Zellen    | 3,53 $\pm$ 0,18 | 526 $\pm$ 13    | 584 $\pm$ 12    | 573 $\pm$ 10    |
| Homogenat | Pellet    | -               | 0,87*           | n.g.            | 1,54*           |
|           | Überstand | -               | 0,85*           | n.g.            | 0,91*           |

Tab.30: Kupferkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der

15. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4), bei Homogenaten M (n=2)

| 15. Woche |           | Kontrollen      | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere     | Rinde     | 16,4 $\pm$ 2,0  | 26,9 $\pm$ 4,3  | 23,8 $\pm$ 4,2  | 19,3 $\pm$ 2,6  |
|           | Mark      | 2,70 $\pm$ 0,08 | 2,80 $\pm$ 0,08 | 3,04 $\pm$ 0,33 | 2,87 $\pm$ 0,23 |
| Leber     |           | 5,57 $\pm$ 0,06 | 5,04 $\pm$ 0,21 | 5,07 $\pm$ 0,25 | 5,35 $\pm$ 0,26 |
| Mukosa    |           | 1,87 $\pm$ 0,03 | 2,12 $\pm$ 0,11 | 2,09 $\pm$ 0,11 | 2,11 $\pm$ 0,11 |
| Blut      | Plasma    | 1,31 $\pm$ 0,16 | 1,52 $\pm$ 0,16 | 1,28 $\pm$ 0,07 | 1,27 $\pm$ 0,09 |
|           | Zellen    | 0,89 $\pm$ 0,14 | 0,80 $\pm$ 0,04 | 0,88 $\pm$ 0,04 | 1,17 $\pm$ 0,13 |
| Homogenat | Pellet    | 9,10            | 22,1            | n.g.            | 8,84            |
|           | Überstand | 3,22            | 5,74            | n.g.            | 3,86            |

Tab.31: Cadmiumkonzentrationen [ $\mu\text{g/g}$  F. G. bzw.  $\mu\text{g/ml}$ ] nach der 15. Woche des Zeitversuchs

M  $\pm$  SEM (n=4), bei Homogenaten M (n=2)

\* = Bestimmung mit AAS

| 15. Woche           |        | Kontrollen | Basisgr.        | As-I            | As-II           |
|---------------------|--------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Niere               | Rinde  | -          | 5,87 $\pm$ 0,33 | 4,79 $\pm$ 0,03 | 5,26 $\pm$ 0,23 |
|                     | Mark   | -          | 0,26 $\pm$ 0,03 | 0,23 $\pm$ 0,02 | 0,29 $\pm$ 0,04 |
| Leber               |        | -          | 0,98 $\pm$ 0,07 | 0,99 $\pm$ 0,10 | 1,24 $\pm$ 0,20 |
| Mukosa              |        | -          | 12,8 $\pm$ 0,09 | 11,3 $\pm$ 1,9  | 11,0 $\pm$ 1,0  |
| Blut                | Plasma | -          | -               | -               | -               |
|                     | Zellen | -          | 1,44 $\pm$ 0,01 | 1,48 $\pm$ 0,05 | 1,63 $\pm$ 0,07 |
| Pellet              |        | -          | 2,38*           | n.g.            | 1,36*           |
| Homogenat Überstand |        | -          | 0,85*           | n.g.            | 0,78*           |

Tab.32: Zunahme des Körpergewichts in Abhängigkeit von der Zeit und dem Metallgehalt in den Diäten

M  $\pm$  SEM (n= 16) bis 1. Woche, (n=12) 2.-3. Woche

(n=8) 4.-7. Woche, (n=4) 8.-15. Woche

| Zeitpunkt   | Kontrolle    | Basisgr.     | As-I         | As-II        |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Start Zeit0 | 173 $\pm$ 3  | 177 $\pm$ 3  | 172 $\pm$ 3  | 169 $\pm$ 2  |
| 1.Woche     | 205 $\pm$ 4  | 211 $\pm$ 4  | 210 $\pm$ 3  | 204 $\pm$ 4  |
| 2. "        | 234 $\pm$ 5  | 242 $\pm$ 4  | 236 $\pm$ 5  | 226 $\pm$ 3  |
| 3. "        | 247 $\pm$ 5  | 260 $\pm$ 5  | 247 $\pm$ 5  | 214 $\pm$ 4  |
| 4. "        | 266 $\pm$ 8  | 274 $\pm$ 6  | 265 $\pm$ 9  | 249 $\pm$ 6  |
| 5. "        | 272 $\pm$ 8  | 282 $\pm$ 7  | 278 $\pm$ 8  | 249 $\pm$ 8  |
| 6. "        | 285 $\pm$ 10 | 296 $\pm$ 7  | 292 $\pm$ 9  | 278 $\pm$ 8  |
| 7. "        | 284 $\pm$ 8  | 301 $\pm$ 8  | 296 $\pm$ 10 | 279 $\pm$ 9  |
| 8. "        | 287 $\pm$ 6  | 302 $\pm$ 12 | 283 $\pm$ 13 | 287 $\pm$ 14 |
| 10. "       | 286 $\pm$ 8  | 308 $\pm$ 13 | 282 $\pm$ 8  | 292 $\pm$ 13 |
| 11. "       | 292 $\pm$ 8  | 316 $\pm$ 13 | 287 $\pm$ 8  | 301 $\pm$ 12 |
| 15. "       | 295 $\pm$ 8  | 341 $\pm$ 20 | 311 $\pm$ 7  | 320 $\pm$ 13 |

Tab.33: Ernährungsphysiologische Parameter bei Verfütterung der verschiedenen Diäten während der Pilotstudie  
M  $\pm$  SD (n=5), bei Kontrollen (n=2)

| Gruppe    | Gewichtszunahme (g/Tier) |             | Futter-<br>aufnahme<br>g/d/Tier | Trinkwasser-<br>aufnahme<br>ml/d/Tier |
|-----------|--------------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------------|
|           | 1. Woche                 | 2. Woche    |                                 |                                       |
| Kontrolle | 46 $\pm$ 6               | 63 $\pm$ 20 | 22 $\pm$ 1                      | 23 $\pm$ 10                           |
| Basisgr.  | 50 $\pm$ 5               | 54 $\pm$ 8  | 19 $\pm$ 1                      | 23 $\pm$ 4                            |
| As- I     | 63 $\pm$ 15              | 65 $\pm$ 11 | 20 $\pm$ 2                      | 23 $\pm$ 5                            |
| As- II    | 58 $\pm$ 12              | 60 $\pm$ 5  | 20 $\pm$ 2                      | 21 $\pm$ 2                            |
| As- III   | 52 $\pm$ 7               | 66 $\pm$ 7  | 19 $\pm$ 1                      | 18 $\pm$ 5                            |
| As- IV    | 46 $\pm$ 6               | 57 $\pm$ 6  | 17 $\pm$ 1                      | 19 $\pm$ 3                            |
| Kontrolle | 53 $\pm$ 8               | 52 $\pm$ 6  | 23 $\pm$ 1                      | 21 $\pm$ 1                            |
| Basisgr.  | 57 $\pm$ 7               | 45 $\pm$ 10 | 22 $\pm$ 1                      | 23 $\pm$ 5                            |
| Cd- I     | 66 $\pm$ 6               | 64 $\pm$ 9  | 22 $\pm$ 2                      | 26 $\pm$ 4                            |
| Cd- II    | 64 $\pm$ 8               | 59 $\pm$ 6  | 22 $\pm$ 1                      | 25 $\pm$ 4                            |
| Cd- III   | 54 $\pm$ 11              | 61 $\pm$ 13 | 21 $\pm$ 2                      | 23 $\pm$ 2                            |
| Cd- IV    | 55 $\pm$ 12              | 58 $\pm$ 14 | 20 $\pm$ 1                      | 20 $\pm$ 3                            |
| Kontrolle | 47 $\pm$ 15              | 62 $\pm$ 18 | 20 $\pm$ 1                      | 23 $\pm$ 1                            |
| Basisgr.  | 50 $\pm$ 10              | 62 $\pm$ 15 | 21 $\pm$ 5                      | 23 $\pm$ 3                            |
| Ni- I     | 48 $\pm$ 10              | 60 $\pm$ 12 | 23 $\pm$ 2                      | 22 $\pm$ 3                            |
| Ni- II    | 51 $\pm$ 13              | 49 $\pm$ 16 | 20 $\pm$ 2                      | 22 $\pm$ 3                            |
| Ni- III   | 37 $\pm$ 7               | 62 $\pm$ 21 | 21 $\pm$ 2                      | 22 $\pm$ 3                            |
| Ni- IV    | 33 $\pm$ 4               | 52 $\pm$ 15 | 20 $\pm$ 2                      | 24 $\pm$ 3                            |
| Kontrolle | 59 $\pm$ 8               | 64 $\pm$ 4  | 21 $\pm$ 5                      | 24 $\pm$ 3                            |
| Basisgr.  | 52 $\pm$ 11              | 63 $\pm$ 14 | 20 $\pm$ 4                      | 23 $\pm$ 4                            |
| Pb- I     | 58 $\pm$ 7               | 62 $\pm$ 17 | 21 $\pm$ 3                      | 27 $\pm$ 3                            |
| Pb- II    | 55 $\pm$ 7               | 61 $\pm$ 7  | 20 $\pm$ 4                      | 28 $\pm$ 4                            |
| Pb- III   | 45 $\pm$ 8               | 61 $\pm$ 10 | 19 $\pm$ 5                      | 30 $\pm$ 4                            |
| Pb- IV    | 50 $\pm$ 10              | 59 $\pm$ 15 | 19 $\pm$ 5                      | 26 $\pm$ 4                            |

Tab.34: Urinvolumen [ml/8 h] bei Verfütterung der Kontrolldiät, der Basisdiät und der As-III Diät  
M  $\pm$  SEM (n=4-5)

| Tag | Kontrollen      | Basisgruppe     | As-III Gruppe   |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0.  | 2,30 $\pm$ 0,26 | 2,18 $\pm$ 0,20 | 2,01 $\pm$ 0,31 |
| 1.  | 0,97 $\pm$ 0,18 | 2,70 $\pm$ 0,48 | 2,26 $\pm$ 0,36 |
| 2.  | 1,88 $\pm$ 0,22 | 2,94 $\pm$ 0,45 | 1,95 $\pm$ 0,16 |
| 4.  | 1,83 $\pm$ 0,37 | 3,42 $\pm$ 0,35 | 2,58 $\pm$ 0,52 |
| 8.  | 1,82 $\pm$ 0,25 | 2,62 $\pm$ 0,38 | 3,12 $\pm$ 0,49 |
| 14. | 2,88 $\pm$ 0,37 | 3,73 $\pm$ 0,52 | 3,01 $\pm$ 0,09 |

**Tab.35: Aktivität der alkalischen Phosphatase im Urin bei Verfütterung der Kontrolldiät, der Basisdiät und der As-III Diät [mU/ml] und [mU/8 h Urinvolumen]**  
M  $\pm$  SEM (n=4-5)

| Tag | Kontrollen      |              | Basisgruppe     |               | As-III Gruppe  |              |
|-----|-----------------|--------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|
| 0.  | 84,7 $\pm$ 11,8 | 194 $\pm$ 31 | 76,4 $\pm$ 10,9 | 165 $\pm$ 25  | 74,0 $\pm$ 8   | 163 $\pm$ 24 |
| 1.  | 72,8 $\pm$      | 146 $\pm$    | 57,9 $\pm$ 14,5 | 167 $\pm$ 31  | 86,1 $\pm$ 25  | 207 $\pm$ 65 |
| 2.  | 116 $\pm$ 21    | 209 $\pm$ 29 | 112 $\pm$ 40    | 290 $\pm$ 73  | 86,0 $\pm$ 34  | 179 $\pm$ 71 |
| 4.  | 105 $\pm$ 51    | 230 $\pm$ 93 | 103 $\pm$ 44    | 314 $\pm$ 96  | 43,6 $\pm$ 6   | 129 $\pm$ 21 |
| 8.  | 168 $\pm$ 32    | 315 $\pm$ 47 | 97,3 $\pm$ 25,5 | 285 $\pm$ 80  | 76,5 $\pm$ 8,5 | 274 $\pm$ 44 |
| 14. | 126 $\pm$ 13    | 359 $\pm$ 57 | 117 $\pm$ 30    | 458 $\pm$ 128 | 74,4 $\pm$ 12  | 224 $\pm$ 21 |

**Tab.36: Kupfer- und Arsenkonzentrationen im Urin bei Fütterung von Diäten mit steigendem Arsengehalt**  
M  $\pm$  SEM (n=5)  
[ $\mu$ g/ml Urin] und [ $\mu$ g/8 h Urinvolumen]

| Tag    | Kontrolle |           | Basisgruppe |           | As-III Gruppe |           |
|--------|-----------|-----------|-------------|-----------|---------------|-----------|
| Kupfer |           |           |             |           |               |           |
| 0.     | 0,49±0,05 | 1,12±0,16 | 0,62±0,05   | 1,36±0,17 | 0,49±0,07     | 0,91±0,05 |
| 1.     | 0,78±0,10 | 0,94±0,20 | 0,24±0,04   | 0,60±0,10 | 0,21±0,03     | 0,47±0,09 |
| 2.     | 0,57±0,03 | 1,06±0,09 | 0,20±0,03   | 0,57±0,12 | 0,20±0,03     | 0,38±0,04 |
| 4.     | 0,47±0,05 | 0,85±0,17 | 0,41±0,09   | 1,37±0,28 | 0,24±0,02     | 0,59±0,09 |
| 8.     | 0,54±0,09 | 0,91±0,10 | 0,60±0,17   | 1,16±0,16 | 0,34±0,06     | 1,02±0,25 |
| 14.    | 0,52±0,04 | 1,46±0,11 | 0,49±0,10   | 1,68±0,26 | 0,31±0,04     | 0,94±0,14 |
| Arsen  |           |           |             |           |               |           |
| 0.     | -         | -         | -           | -         | -             | -         |
| 1.     | -         | -         | 0,79±0,09   | 2,06±0,37 | 7,59±1,47     | 16,1±2,8  |
| 2.     | -         | -         | 1,01±0,18   | 2,79±0,51 | 9,87±1,26     | 18,9±2,2  |
| 4.     | -         | -         | 0,95±0,12   | 3,16±0,30 | 13,9±1,85     | 34,9±6,5  |
| 8.     | -         | -         | 0,95±0,19   | 2,28±0,39 | 56,0±19,0     | 143 ± 16  |
| 14.    | -         | -         | 0,99±0,16   | 3,41±0,42 | 51,6± 6,5     | 156 ± 20  |

Tab.37: Interelementstörungen an der ICP-AES in der Matrix einer aufgeschlossenen

Leber und in 6,5 % Salpetersäure

Werte in µg/ml Meßlösung

$M \pm SD$  (n=6-8), r = Korrelationskoeffizient

RTL- Matrix = Matrix einer aufgeschlossenen Rattenleber

| Störung | Konzentration des Standards |                     | vorgetäuschte Konzentration |                     |
|---------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
|         | RTL- Matrix                 | 6,5 % Salpetersäure | RTL- Matrix                 | 6,5 % Salpetersäure |
| As-Cd   | 1,1 $\pm$ 0,06              | 0,849 $\pm$ 0,002   | 0,009 $\pm$ 0,001           | 0,009 $\pm$ 0,001   |
|         | 2,35 $\pm$ 0,11             |                     | 0,022 $\pm$ 0,000           |                     |
|         | 4,58 $\pm$ 0,13             | 4,18 $\pm$ 0,02     | 0,043 $\pm$ 0,000           | 0,042 $\pm$ 0,002   |
|         | 9,76 $\pm$ 0,30             | 8,32 $\pm$ 0,06     | 0,092 $\pm$ 0,001           | 0,083 $\pm$ 0,004   |
|         |                             |                     | r = 0,996                   | r = 0,996           |
| Ni-Tl   | 1,14 $\pm$ 0,04             | 0,957 $\pm$ 0,205   | 0,047 $\pm$ 0,037           | 0,091 $\pm$ 0,111   |
|         | 2,64 $\pm$ 0,18             |                     | 0,160 $\pm$ 0,022           |                     |
|         | 5,41 $\pm$ 0,18             | 5,27 $\pm$ 0,10     | 0,303 $\pm$ 0,052           | 0,390 $\pm$ 0,065   |
|         | 10,7 $\pm$ 0,62             | 10,6 $\pm$ 0,15     | 0,640 $\pm$ 0,108           | 0,641 $\pm$ 0,210   |
|         |                             |                     | r = 0,999                   | r = 0,993           |
| Pb-As   | 1,09 $\pm$ 0,05             | 1,05 $\pm$ 0,03     | 0,016 $\pm$ 0,002           | 0,052 $\pm$ 0,019   |
|         | 2,56 $\pm$ 0,14             |                     | 0,032 $\pm$ 0,009           |                     |
|         | 5,11 $\pm$ 0,30             | 5,00 $\pm$ 0,16     | 0,045 $\pm$ 0,020           | 0,097 $\pm$ 0,019   |
|         | 10,4 $\pm$ 0,64             | 10,2 $\pm$ 0,25     | 0,108 $\pm$ 0,023           | 0,100 $\pm$ 0,027   |
|         |                             |                     | r = 0,990                   | r = 0,842           |

## LEBENS LAUF

03.01.1962

Geboren in München als Tochter des Starkstrommonteurs Alfred Lommer und seiner Ehefrau Erna Lommer geb. Ott.

1968 - 1972

Besuch der Grundschule an der Hugo-Wolf-Straße in München

1972 - 1980

Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums in München

Juni 1980

Abiturprüfung

November 1980 - Dezember 1984

Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Oktober 1982

Ablegen der Lebensmittelchemischen Vorprüfung

21.10.1983

Eheschließung mit Dipl. Ing. (FH) Manfred Schmolke

Dezember 1984

Abschluß des Studiums mit dem 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

Juni 1985 - Oktober 1988

Promotion bei Prof. Dr. Forth im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München





